

SOCIETAS PRO FAUNA ET FLORA FENNICA

ACTA  
BOTANICA FENNICA

34—37

HELSINGFORSIAE 1944



ACTA BOTANICA FENNICA 34  
EDIDIT  
SOCIETAS PRO FAUNA ET FLORA FENNICA

THE PERMEABILITY OF TOLYPELLOPSIS CELLS  
FOR HEAVY WATER AND METHYL ALCOHOL

BY

V. WARTIOVAARA

FROM THE ZOOPHYSIOLOGICAL LABORATORY, UNIVERSITY OF COPENHAGEN

HELSINGFORSIAE 1944

PRINTED BY  
OY. TILGMANN AB. HELSINKI 1944

## Introduction.

Among the substances most often used in studies of cellular permeability water occupies a very special position. Although the monovalent alcohols and especially the methyl alcohol, considered as methylated water, form a connecting link between the water and organic anelectrolytes, only very few of the permeability series so far published comprise the water or the monovalent alcohols along with the other anelectrolytes.

On the other hand there is no lack of special studies concerned with the water or alcohol permeability of many different cell types, but their results are on the whole not very accurate and cannot be directly compared with those of the systematic permeability studies.

This is due, mainly, to two causes.

1. It is usually necessary to study the permeation of water as a mass-movement or filtration process, brought about by differences in osmotic or hydrostatic pressure, while the permeation of other substances is studied as a diffusion process. The results are therefore expressed in totally different units of measure<sup>1</sup>. It is true that the osmotic pressure can be described as a water concentration difference and thus the permeation rate for water expressed in the same way and by the same units as employed for other compounds; but even so it is possible to doubt whether the result would be the same if the permeation of water could take place as diffusion pure and simple, like that of other substances.

2. The second cause which compromises the comparison of water and alcohol with the rest of the anelectrolytes is the extremely high permeation rate of the firstnamed substances which makes sufficiently accurate determinations extremely difficult to obtain. In plant cells we have as a further difficulty the effect of the cellulose wall which reduces the permeability to an extent which it is usually impossible to determine.

The first difficulty can be overcome by means of heavy water, which opens up the possibility of working with a solution of water in water and allows a comparison with, say, alcohol in water as quite similar diffusion processes.

<sup>1</sup> Comp. BACHMANN (1939) and the discussions by FREY-WYSSLING and v. RECHENBERG-ERNST (1943) which latter are not, however, quite to the point.

There is no doubt a definite difference between the rates of permeation of ordinary and heavy water (BROOKS 1935, PARPART 1935, BROOKS 1937), but the permeation mechanism should be practically the same for both.

In an earlier study (WARTIOVAARA 1942) the writer was able largely to overcome the technical difficulties due to high permeation rates by measuring the rates at which the compound dealt with would come out from large cells of Characeæ into small volumes of water. The quantity obtained in each experimental period is thus directly determined by analysis. Using a somewhat altered set up the permeation of methyl alcohol and heavy water could be measured easily and with sufficient accuracy in periods down to 10 seconds.

The experiments to be described were carried out on the internodal cells of *Tolypellosis stelligera*, an alga belonging to the Characeæ, partly because these cells are well suited for the purpose, but also because they are nearly related to the *Chara ceratophylla*, on which COLLANDER and BÄRLUND made their extensive permeability studies, and can be taken to show very similar permeabilities (WARTIOVAARA 1942 p. 75).

### Methods.

The plants used were collected at the southern shores of Finland and sent to Copenhagen packed in moist paper. They were kept there for 7 weeks in artificial brackish water of 1% salinity at 12° C and exposed only to a weakened daylight. The growth during this period was very slight. The plants which were collected about the end of their natural vegetation period were evidently in a state of rest, very favourable from the point of view of the uniformity of the material for physiological purposes.

Single internodal cells were prepared a few hours before each experiment. Their diameter varied from 0.6 to 0.8 mm with a length of about 70 mm. They were regular cylinders with a volume of about 30  $\mu\text{l}$ . Each experiment was made on one single cell.

The essential part of the apparatus shown in fig. 1 is a glass tube (d) about 4 mm in diameter (fig. 2), expanded at the top and provided with a side tube, while the lower end is narrowed down to capillary dimensions. The cell to be studied is placed in this tube and pressed lightly against one side by means of two 0.5 mm glass rods sealed together at both ends (fig. 2, right). In consequence of this arrangement air bubbles can glide freely upwards and break without producing spray, and when the tube is emptied the water will flow off quickly and almost completely.

The tube is first filled with a solution of the substance to be studied, which is kept in contact with the cell for several minutes and well mixed by air

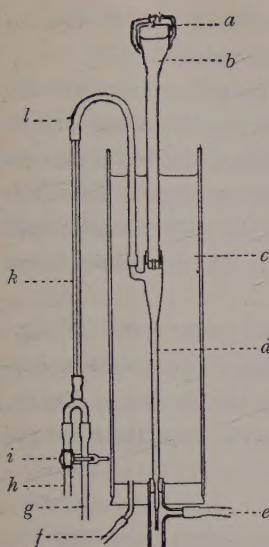


Fig. 1. The apparatus. *a* rubber membrane, *b* water reservoir, *c* temperature bath, *d* glass tube for holding the cell, *e* tube carrying dry, filtered air, *f* air pipe for mixing water in temperature bath, *g* compressed air tube, *h* suction tube, *i* clip, *k* capillary tube, *l* connecting rubber tube.

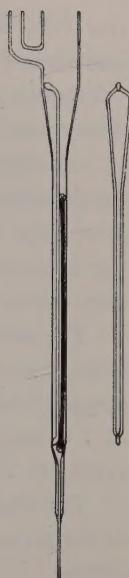
Fig. 2. The tube *d* with the cell (black). Right the glass rods holding the cell, frontal view.

bubbles sucked through from below. Thereupon this solution is allowed to drain off, a water reservoir (*b*) is connected to the top of (*d*), a piece of rubber tubing (*i*) to the side tube and the whole is arranged in a waterbath (*c*). This is filled with water of the desired temperature which is kept mixed by air. The opening of the reservoir (*b*) is so narrow that the water cannot flow out except under pressure. Pressure can be applied through (*g*, *k*, *l*) and causes an air bubble to enter (*b*). By the same pressure the solution is emptied out from (*d*). When next suction is applied (*h*, *k*, *l*) a definite volume of water is let out from (*b*) and covers the cell and at the same time air begins to bubble through from (*e*). The volume of water, let out every time suction replaces pressure, is regulated by the rubber membrane (*a*) which is adjusted by a screw<sup>1</sup>.

The connection of the apparatus with either the suction or the pressure was brought about instantaneously by a clip (*i*). Suction and pressure were regulated to about the same difference from the atmosphere of about 20—50 cm water. The capillary (*k*) regulates the flow of air and slows down the rise in pressure sufficiently to allow the solution to drain off from the walls of the tube (*d*) and the cell. The dimensions of the separate parts were tried out until a volume of water of 100—200  $\mu\text{l}$  could be exchanged in one second.

Because the heavy water is hygroscopic the air used for mixing had to be dry, and at the same time the lower end of (*d*) had to be easily accessible in order to collect the solution samples. The dry air was let in through (*e*). Even if this was perhaps unnecessary on account of the low concentration of the solutions and the brief experimental periods, the tube was useful as a protection for the capillary. When the solution had to be changed a micro

<sup>1</sup> This detail was not fully satisfactory as the volume variations were too large. Some kind of pump would no doubt be better.



test tube was introduced so that the capillary reached well into it and for one second pressure was applied instead of the normal suction.

Before any determinations of the diffusion from the cell were made the water was changed several times during a period corresponding more or less to the elimination of one half of the available quantity of the substance to be determined, in order to have a regular concentration gradient. Then followed the changes in accurately measured periods of the same length, and the solutions emptied out were collected for analysis. The sampling tubes were closed with paraffin stoppers.

The solution used for the experiments was distilled water with 30 mg/l  $\text{CaCl}_2$  and neutralized to  $\text{p}_\text{H}$  7 with 13.7 mg/l  $\text{NaHCO}_3$ . This solution corresponds fairly well to the natural environment of the plants and at the  $\text{p}_\text{H}$  of 7 is not too sensitive to the  $\text{CO}_2$  of the atmosphere. All experiments were made at 20° C.

The  $\text{D}_2\text{O}$  had a concentration between 30 and 50 %. The same quantity of 0.3 ml could be used to saturate cells several times before becoming too dilute.

From the point of view of the accuracy of the results the highest possible concentration is to be preferred. Even concentrations of about 100 % do not apparently damage the cells, but when brought from this into ordinary water the cells would often burst. This never happened with 50 %  $\text{D}_2\text{O}$ . The plasma rotation continued undisturbed throughout, and the cells would keep alive at least for several days afterwards.

The methyl alcohol was used as 5 %, that is about 1.6 molar, solution. It had no visible effect on the cells during or after the experiments. The narcotic effects of methyl alcohol on plant cells is known to be slight and the osmotic effect small only.

The volumes of the water samples were determined by weighing and no account was taken of the very slight differences in specific gravity.

The concentration of DHO in the samples was at first determined in the usual way, after purification by repeated distillation, by determination of the specific gravity of the distillate according to the method of LINDERSTRÖM-LANG (1938), in which drops of the unknown solution are placed in a vertical tube containing mixtures of bromo-benzol and gasoline, showing a regularly increasing specific gravity from top to bottom, and their position accurately compared with drops of known specific gravity; but it was found that the concentrations of other constituents remained so constant that a direct determination of the specific gravity of the samples by the same method could give results of sufficient accuracy<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> The determinations were kindly carried out by dr. USSING and Mrs. SCHAU FUSS.

The determinations of methyl alcohol were carried out as follows:

A 0.01 molar solution of potassium bichromate in conc. sulphuric acid was added to each sample by a syringe pipette (KROGH 1935). After cooling the mixture was washed into a larger vessel with about 20 volumes of water and the surplus bichromate titrated iodometrically by means of thiosulphate.

The permeation constant was calculated from the equation (COLLANDER & BÄRLUND 1933 p. 26)

$$(1) \quad P = \frac{v}{t \cdot q} \ln \frac{C}{C-c}$$

in which  $P$  is the permeation constant,  $t$  the time,  $v$  the cell volume,  $q$  the cell surface,  $C$  the concentration of the diffusing substance at the beginning of each period and  $c$  the decrease in concentration during the period  $t$ .

In practice the following equation was employed

$$(2) \quad P = 3.45 \frac{d}{t} \log k$$

in which  $d$  is the cell diameter in mm,  $t$  the time in minutes and  $k$  the relation between quantities of the substance diffusing out in consecutive periods. In this equation  $P$  is obtained in cm/hour, although  $t$  and  $d$  are measured in minutes and mm. The equation is obtained from (1) by changing into ordinary logarithms, substituting  $\frac{d}{4}$  for  $\frac{v}{q}$  (relation between cylinder volume and surface) and combining all constants into one. The substitution of  $k$  for  $\frac{C}{C-c}$  can be made, because the rate of diffusion at any moment is directly proportional to the inside concentration at that moment.

This latter relation is of special interest, because in my experiments the quantities diffusing out of the cell in consecutive periods are determined instead of the concentration in the cell sap. When the periods are of the same length we get a series of  $k$ -values (in principle identical) from which to calculate the permeation constant according to equation (2).

The experimental arrangement adopted makes it possible to avoid one source of error which is very common in experiments on rapid diffusion. When namely the diffusion resistance of the plasma membrane is of the same order of magnitude as that of the other constituents of the cell — including the sap — it is necessary to allow for the time which is required at first to establish a definite concentration gradient. With my arrangement it is unnecessary to begin measuring the rate of permeation just after changing from the saturating solution to water. One can wait until the concentration gradient is

stabilized. Without this arrangement it would scarcely be possible to measure the rate of methyl alcohol permeation in freshly killed cells, which show a half-value period only 3 times longer than that of a corresponding cylinder of pure water.

### Sources of systematic error and corrections.

The very rapid permeation of the substances dealt with will cause certain rather large errors in the results as directly obtained, for which quantitative allowance must be made.

The analyses are mainly liable to positive errors. Negative errors, due e.g. to evaporation, will, on account of the low concentrations, be insignificant, but accidental, even if small, impurities will have a definite positive effect. Larger errors of this kind will show up as distinct aberrations from the curves representing the experiments.

The fact that a certain fraction of the solution in the experimental vessel is not emptied out and takes up some of the substance diffusing out diminishes the concentration gradient and causes a negative error. This error is nearly constant and can be eliminated by calculation. When the water is changed at constant intervals a definite relation is established after a few changes between the surplus left over from one change and the deficit of the next. Since the quantities diffusing out decrease regularly the surplus is always larger than the deficit and in the same proportion throughout.

The external concentration which reduces the permeation has a minimum, just when the water has been changed, and a maximum just before the next change. When the external concentration is kept low compared with the internal it can be assumed that the error of the permeation constant, as calculated directly from the analyses, is proportional to the (relative) external concentration. Just after a change of water we have approximately:

$$(3) \quad \frac{\text{External conc.}}{\text{Internal conc.}} = p \frac{v}{V} \frac{k-1}{1-pk}$$

and just before the next change

$$(4) \quad \frac{\text{External conc.}}{\text{Internal conc.}} = \frac{v}{V} \frac{k-1}{1-pk}$$

in which  $v$  is the cell volume,  $V$  the external water volume, of which  $pV$  is left over, and  $k$  the relation between two consecutive quantities diffused out<sup>1</sup>. The volumes both of the cell and the external solution are easily deter-

<sup>1</sup> If each analysis corresponds to two samples  $\sqrt{k}$  is to be substituted for  $k$  in the equations (3) and (4).

mined by weighing. The residual water is determined by filling in a solution which does not penetrate the cell. When such a solution is let out and the apparatus then washed, an analysis of the washing fluid will give the residue. The highly colloidal pigment T 1824 which can easily be determined colorimetrically was employed for the purpose.

External conc.

The average  $\frac{\text{External conc.}}{\text{Internal conc.}}$  which opposes the diffusion is calculated from the figures  $v=30 \mu\text{l}$ ,  $V=150 \mu\text{l}$ ,  $p=0.2$ . For  $k=1.5$  we find for (3) the value 0.08 and for (4) 0.14 with the average 0.085 or about 9 %.

The result is highly dependent on the value of  $k$  and becomes 20 % for  $k=2$  and 36 % for  $k=2.5$ .

The equations (3) and (4) are arrived at as follows:

The quantity diffusing out from the cell is reduced by  $\frac{1}{k}$  for each period and, since it is proportional to the inside concentration, the quantity left inside is also reduced by  $\frac{1}{k}$  during each period.

Taking the inside quantity at the beginning of the first period as unity we have at the beginning of the second period  $\frac{1}{k}$  left, and the difference  $1 - \frac{1}{k} = \frac{k-1}{k}$  has diffused out. At the beginning of the  $n^{\text{th}}$  period we have inside the cell  $\frac{1}{k^{n-1}}$  and at the end  $\frac{1}{k^n}$  while  $\frac{k-1}{k^n}$  has diffused out.

The quantities diffusing out are reduced at each change of water to  $\frac{pv}{V}$ , and at the beginning of the  $n^{\text{th}}$  period after  $n-1$  changes of water we have left from the first portion  $\frac{k-1}{k}$  only  $p^{n-1} \frac{k-1}{k}$  and from the following increasing fractions up to and including  $p \frac{k-1}{k^{n-1}}$  or in all

$$p^{n-1} \frac{k-1}{k} + p^{n-2} \frac{k-1}{k^2} + \dots + p^2 \frac{k-1}{k^{n-2}} + p \frac{k-1}{k^{n-1}} = \\ (k-1) \left( \frac{p^{n-1}}{k} + \frac{p^{n-2}}{k^2} + \dots + \frac{p^2}{k^{n-2}} + \frac{p}{k^{n-1}} \right)$$

and the relation

$$(3) \quad \frac{\text{External conc.}}{\text{Internal conc.}} = \frac{v}{V} (k-1) (p^{n-1} k^{n-2} + \dots + p^2 k + p) = \\ \frac{v}{V} (k-1) \left[ \sum_{1}^n p (pk)^{n-2} \right] = p \frac{v}{V} \cdot \frac{k-1}{1-pk} \text{ when we put } n=\infty.$$

Similarly we find for the end of the  $n^{\text{th}}$  period

$$(4) \frac{\text{External conc.}}{\text{Internal conc.}} = \frac{v}{V} (k-1) (p^{n-1} k^{n-1} + p^{n-2} k^{n-2} + \dots + p^2 k^2 + pk + 1) = \frac{v}{V} (k-1) \left[ \sum_{i=1}^n i (pk)^{n-i} \right] = \frac{v}{V} \cdot \frac{k-1}{1-pk}.$$

The error introduced by taking  $n = \infty$  is insignificant, because the series converges rapidly towards 0 when  $p$  is sufficiently small.

The analytical results when corrected will therefore give a true picture of the diffusion, except for the irregular variations due to variations in the quantity of water left over from one period to the next. These are accidental and will check out in the mean.

The time during which the cell is dry at each change of solution causes an apparent lowering of the permeation rate. This error is very difficult to estimate, but one cannot go far wrong by judging it to make up about  $\frac{1}{2}$  the total time for each change. In the experiments on dead cells, in which the water was changed every 10 seconds, the period should therefore be reduced by 5 %. In experiments on living cells the correction is smaller, because the periods were longer.

Some methyl alcohol is evaporated into the air sucked through. In a control experiment with a known alcohol solution the error on this account amounted to a few %. In the actual experiments it is largely eliminated by the calculation of the permeation constant according to equation (2), because only the alcohol diffused out into the water is exposed to evaporation and the relative loss must be approximately constant.

Because the vapour pressure is reduced more rapidly than the concentration the quantities analysed will be more slowly diminished than those actually diffusing out, but the error on the permeation constant is so small as to be completely overshadowed by the accidental variations.

The sources of error now discussed cause the permeation constant to be reduced by 10 to 12 % and are easily allowed for. Two further factors viz. the diffusion resistance of the cell wall and the equilibrium concentration of the substance investigated are decidedly more important and have to be taken quantitatively into account before it is possible to obtain any information of value concerning the permeability of the protoplasma membranes.

If we assume that the abolition of the semipermeability of the plasma membranes is the only change in permeability brought about by the death of the cell the diffusion resistance of the membranes can be calculated by subtracting the resistance of the freshly killed from that of the living cell. Since the diffusion resistance is inversely proportional to the permeability we have

$$(5) \quad P = \frac{P_d \cdot P_l}{P_d - P_l}$$

in which  $P$  is the permeability of the plasma membranes.  $P_l$  that of the living and  $P_d$  that of the dead cell (WARTIOVAARA 1942).

The above assumption is probably not completely correct. The diffusion resistance of the plasma between the two membranes is probably altered by the death of the cell, but it seems probable that the influence of this thin and very watery layer is extremely small whether dead or alive and probably not much higher than that of a corresponding layer of water.

When the cell dies the turgor is abolished and the volume shrinks about 5 %, corresponding to a reduction in diameter of about 2.5 % which is taken into account in the permeability calculations. It is possible, however, that the permeability of the cell wall is somewhat reduced by the shrinkage.

Determinations of the permeability of dead cells were made on the same cells which had served for experiments in the living state. The cell was left in the tube (d) and killed by placing this in hot water (60–70°). Thereupon all substances able to diffuse out through the cellulose wall were removed by several hours treatment with running water (fig. 3). The determinations of permeability were made as with living cells.

The «non-solvent space» of *Tolyphelopsis* cells is evidently very small. With ethyleneglycol for instance osmotic equilibrium is reached only when the concentration inside the cells is equal to that outside. DHO will no doubt behave in the same way, and it was deemed unnecessary to specially determine the equilibrium concentration. Methyl alcohol on the other hand belongs to that group of substances which are at equilibrium definitely less concentrated in the cell sap than outside, at least in the case of *Chara* (COLLANDER & BÄRLUND 1933). It appeared necessary, therefore, to find out whether the cells of *Tolyphelopsis* would show the same peculiarity, because that would mean that the cell would be more rapidly saturated (and again emptied) or, in other words, that the permeation is more rapid than corresponding to the real permeability. It was to be expected, further, that no such anomaly exists in the cells when killed, so that the  $P$  value, calculated according to (5) would be even more dependent on the equilibrium content of methyl alcohol than the  $P_l$  value.

On account of the volatility of the methyl alcohol the cell sap could not

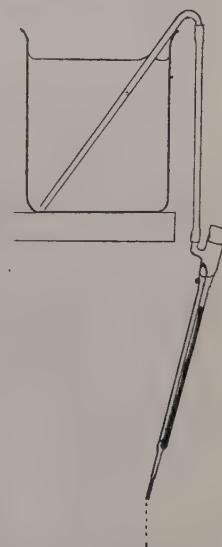


Fig. 3. Washing out a killed cell.



Fig. 4. Arrangement for determining the equilibrium concentration. Above the capillary tube, containing the cells, is shown an air bubble which, sliding back and forth, causes a flow of solution through the capillary tube.

of an hour in a test tube containing a solution of methyl alcohol. The capillary was then rapidly emptied out, wiped off on the outside, transferred to a second, weighed test tube with a known amount of water and rocked until the alcohol was again eliminated. Analyses of the water then gave the total alcohol in the cells and adhering to them in the capillary. This latter amount could be determined from the weight of the second test tube after the introduction of the capillary, the weight of which + the cells alone was known. After subtraction of the adhering amount of alcohol the equilibrium concentration in the cells could be made out.

In similar determinations on killed cells the shrinkage had to be specially determined by weighing without removing them from the capillary. As the cells could not be wiped dry the capillary was filled with a solution of dialysed starch, emptied out and weighed and the quantity of starch left over washed out and determined by analysis. The determination showed a volume diminution by killing of 5 %, which agrees perfectly with the decrease in weight observed when living cells are allowed to transpire in air until the turgor is lost. The killed cells would collapse when brought into a 1 molar alcohol solution. They were therefore first treated with a solution containing some NaCl and thereupon with several changes of pure alcohol solution. Shrinking at first they would thus regain their normal volume.

In the killed cells a distribution coefficient of 0.93—0.97 was obtained showing that no gross errors were involved in the procedure. The fact that the value is lower than unity can be ascribed mainly to the non solvent parts of the cell wall and protoplasm which are included in the weight. On the living cells the mean of 4 determinations was 0.86 (0.840, 0.855, 0.850, 0.884).

When the correction factor for dead cells is put at 1.0, which we need not hesitate to do, the corresponding factor for living cells must be raised to 0.89.

### Results.

The results obtained with heavy water are summarized in tables 1 and 2 and in the curve fig. 5. In the tables both the analytical determinations and the permeation constants calculated from equation (2) without any cor-

be analysed directly and the following procedure was adopted. Cells were weighed and enclosed in a thinwalled capillary with two openings (fig. 4) and rocked for about a quarter

Table 1.

Results of experiments with heavy water. Living cells.  $t$  time in minutes,  $d$  diameter of cells in mm.,  $a$  quantities eliminated in arbitrary units,  $k$  relation between successive quantities.

$t$	Cell 1 $d = 0.80$		Cell 2 $d = 0.70$		Cell 3 $d = 0.71$		Cell 4 $d = 0.66$		Cell 5 $d = 0.70$	
	$a$	$k$								
0—1	66.1		80.6		89.3		69.1		101.0	
		2.32		2.99		2.94		2.42		2.25
1—2	28.5		26.9		30.4		28.5		45.0	
		2.41		2.21		2.25		2.43		2.31
2—3	11.8		12.2		13.5		11.5		19.5	
		2.95		2.54		1.55		2.49		2.41
3—4	4.0		4.8		3.7		4.7		8.1	
Mean	—	2.56	—	2.58	—	2.25	—	2.45	—	2.32
P	4.13		0.99		0.89		0.89		0.88	

Table 2.

Results of experiments with heavy water. Killed cells.

$t$	Cell 1 $d = 0.80$		Cell 2 $d = 0.70$		Cell 3 $d = 0.71$		Cell 4 $d = 0.66$	
	$a$	$k$	$a$	$k$	$a$	$k$	$a$	$k$
0 <sup>00</sup> —0 <sup>20</sup>	29.3		41.5		81.2		69.3	
		1.86		1.66		2.36		2.32
0 <sup>20</sup> —0 <sup>40</sup>	15.7		25.0		34.5		29.9	
		2.15		3.43		2.43		2.66
0 <sup>40</sup> —1 <sup>00</sup>	7.3		7.3		14.2		11.1	
		1.16		2.08		2.68		1.98
1 <sup>00</sup> —1 <sup>20</sup>	6.3		3.5		5.3		5.6	
Mean	—	2.01	—	2.39	—	2.49	—	2.32
P	2.56		2.74		2.91		2.49	

reactions are given. The mean of the latter is 0.93 cm/hour for living and 2.68 cm/hour for dead cells. It is evident from the curve that the elimination follows the exponential law of diffusion processes. The single curves have been omitted, because they would be too irregular, but the theoretical curves corresponding to the P values 0.9 and 2.6 cm/h. have been drawn. To judge from the diagram the error on the mean should not exceed  $\pm 5\%$ .

The initial quantity of heavy water for each cell, put at 100 in the diagram, was calculated as the sum of the geometric series formed by the analytical results. In order to make the results obtained on cells of different dia-

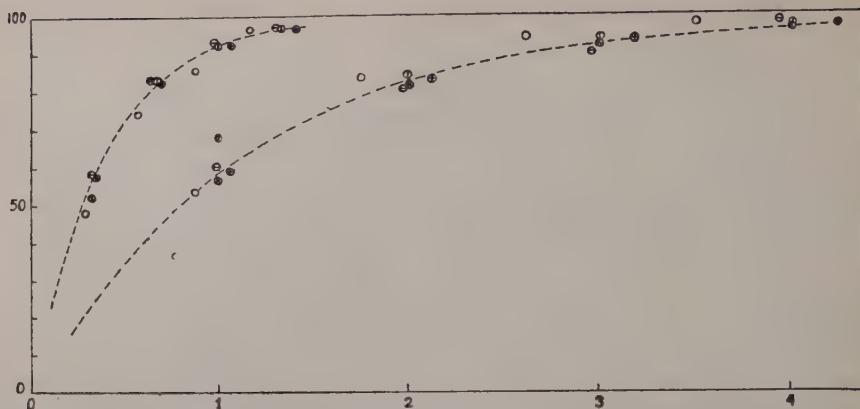


Fig. 5. Elimination of heavy water from living (lower curve) and dead cells. Abscissa, time in minutes, calculated for a cell diameter of 0.7 mm. Ordinate, eliminated quantities in percent of total quantity.

meter directly comparable I have used different time units on the abscissa, since the time  $t$  and the diameter  $d$  are according to equation (2) in inverse proportion. That is why only the points corresponding to cells of 0.7 mm diameter are placed above the whole minute points, although the changes of solution in all cases took place at whole minute (or 20 sec.) intervals.

In view of the difficulties due to the high permeation rate of the heavy water the values obtained on different cells show a satisfactory agreement, and it is possible to utilize them for a calculation of the plasma membrane permeability.

Theoretically this should perhaps be calculated for each cell separately, but since the dispersion of the results is due evidently more to experimental and analytical errors than to real differences in permeability of the cells it seems better to utilize the mean in which the accidental errors have been to a certain extent smoothed out.

The  $P$  value obtained on living cells is somewhat reduced by the incomplete change of solution and by the brief dry periods at each such change. According to the discussion of the sources of error the first of these factors can be put at — 9 % and the second at — 1.7 %.

The  $P$  value should therefore be corrected by multiplication with  $\frac{100}{100-9}$   
 $\times \frac{100}{100-1.7} = 1.12$  and we have  $P_1$  (corr.) =  $1.12 P_1 = 1.04$  cm/h.

The  $P$  values for the dead cells in table 2 were calculated without regard to the diminution in volume at death. This causes a positive error of 2.5 %. The negative errors due to the changes of solution can be put at 9 % and 5 % and we get the final correction

$$P_d \text{ (corr)} = 1.13 \quad P_d = 3.03 \text{ cm/h.}$$

In both cases the corrections are relatively small and their possible errors cannot have any serious influence.

From the corrected values the permeability of the living protoplasmic membrane for heavy water at 20°C is calculated according to (5) as 1.6 cm/h.

This value belongs probably to the molecules DHO which are greatly in excess in dilute solutions.

When cells filled with D<sub>2</sub>O are apt to burst when put into ordinary water this is no doubt due to the slower permeation of heavy water (comp. BROOKS 1937). The difference must be pretty small, however, since only concentrations above 50 % (or about 25 moles) D<sub>2</sub>O begin to be dangerous in this respect.

In the methyl alcohol experiments the dispersion, as seen from tables 3 and 4, appears larger than for the DHO, but this is due, partly at least, to the distribution of the quantity eliminated on a larger number of analyses. This reduces the difference between consecutive analyses (*k* becomes smaller) and the accidental variations become more conspicuous, but the increase in dispersion is counteracted by the larger number of analyses so that the calculated mean *P* values amounting to 0.85 cm/h for living and 1.59 cm/h for dead cells are of about the same reliability. The curves in fig. 6 show that the exosmosis as a whole is regular and the variations in single points accidental and due to errors, analytical and others.

Table 3.  
Results of experiments with methyl alcohol. Living cells.

<i>t</i>	Cell 6		<i>d</i> = 0.66		Cell 7		<i>d</i> = 0.61	
	<i>a</i>	<i>k</i>	<i>a</i>	<i>k</i>	<i>a</i>	<i>k</i>	<i>a</i>	<i>k</i>
0 <sup>00</sup> —0 <sup>30</sup>	1.044		1.609		3.575		3.640	
		1.26		1.35		1.77		1.48
0 <sup>30</sup> —1 <sup>00</sup>	0.827		1.192		2.015		2.472	
		1.32		1.73		1.66		1.33
1 <sup>00</sup> —1 <sup>30</sup>	0.626		0.688		1.222		1.865	
		1.82		1.51		1.76		1.93
1 <sup>30</sup> —2 <sup>00</sup>	0.344		0.456		0.689		0.967	
		1.20		1.76		1.57		1.84
2 <sup>00</sup> —2 <sup>30</sup>	0.286		0.259		0.439		0.525	
		1.76		1.25		1.53		1.64
2 <sup>30</sup> —3 <sup>00</sup>	0.162		0.207		0.287		0.320	
		1.29		1.86		1.44		1.58
3 <sup>00</sup> —3 <sup>30</sup>	0.126		0.111		0.200		0.202	
Mean	—	1.44	—	1.58	—	1.62	—	1.63
P	0.72		0.90		0.88		0.89	

Table 4.

Results of experiments with methyl alcohol. Killed cells.

t	Cell 6		$d = 0.66$		Cell 7		$d = 0.61$	
	$a$	$k$	$a$	$k$	$a$	$k$	$a$	$k$
0 <sup>00</sup> —0 <sup>15</sup>	3.018		0.921		2.920		2.963	
		1.56		1.55		1.64		1.60
0 <sup>15</sup> —0 <sup>30</sup>	1.950		0.590		1.781		1.857	
		1.17		1.74		1.36		2.06
0 <sup>30</sup> —0 <sup>45</sup>	1.660		0.339		1.313		0.900	
		1.66		1.37		1.68		1.28
0 <sup>45</sup> —1 <sup>00</sup>	1.002		0.248		0.780		0.705	
		1.38		1.68		1.50		1.84
1 <sup>00</sup> —1 <sup>15</sup>	0.725		0.158		0.510		0.383	
		1.83		1.13		1.42		1.47
1 <sup>15</sup> —1 <sup>30</sup>	0.396		0.140		0.360		0.260	
		1.14		1.40		1.56		1.44
1 <sup>30</sup> —1 <sup>45</sup>	0.349		0.100		0.281		0.181	
Mean	—	1.46	—	1.47	—	1.54	—	1.62
P	—	1.49	—	1.52	—	1.58	—	1.76

The average curves (not drawn in fig. 6) cut the horizontal corresponding the elimination of  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{3}{4}$  and  $\frac{7}{8}$  at points corresponding to the same lengths of time (the half value period) which is for living cells about 0.8 min. and for those killed about 0.4 min., which would give P values of 0.8 and 1.6 respectively.

It is worthy of special notice that no difference in permeability between

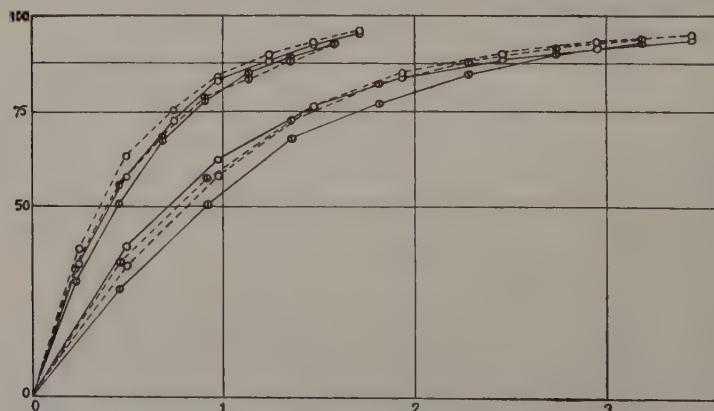


Fig. 6. Elimination of methyl alcohol from living (lower curve) and dead cells. Abscissa, time in minutes, calculated for a cell diameter of 0.6 mm. Ordinate, eliminated quantities in per cent of total quantity.

single cells can be observed and that the half value period remains unaltered between concentrations from 0.8 mol<sup>1</sup> down to 0.08 mol.

The negative errors on the P values for the living cells are the same as in the heavy water experiments, but in addition there is a positive error of 11 %, because the equilibrium concentration of methyl alcohol within the cells is lower than outside. The final correction is

$$P_1 \text{ (corr)} = 0.89 \times 1.12 \cdot P_1 = 0.85 \text{ cm/h.}$$

The dead cells require the same correction as with heavy water and there is at equilibrium the same concentration inside and outside. We have

$$P_d \text{ (corr)} = 1.10 \cdot P_d = 1.75 \text{ cm/h.}$$

Using the corrected figures in equation (5) we find as permeability of the protoplasmic membranes for methyl alcohol at 20° C 1.7 cm/h.

### Discussion.

The present paper is a preliminary attempt to obtain absolute values for the plasma membrane permeability of cells inclosed within a cell wall to substances diffusing very rapidly. It shows that one is not limited to the use of naked protoplasts for experiments with such substances, even when fairly reliable results are aimed at.

We shall first try to make a comparison between the power of permeation of heavy water in »stalk» cells of *Tolypellopsis* with that of ordinary water as measured by PALVA (1939) on »leaf» cells of the same species. It is to be noted that PALVA used an osmotic method and determined the changes in specific gravity brought about by loss of water. From his data he calculated a permeability for water of  $1.08 \mu \cdot \text{Atm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  at 20—21° C. This could, of course, be recalculated into cm/h, but it is safer to work up from the experiments themselves.

According to the curves given by PALVA (p. 268) 50 % of the water lost in an experiment is eliminated on an average in 1.8 minutes and 75 % in 3.2 min. The loss of water can therefore be considered as an exponential function of the force acting, with a half value period of 1.7 min.

The cell diameters are mentioned as being between 0.5 and 0.8 mm, and the average can be taken as 0.7 mm without committing any serious error. When these values ( $d = 0.7$ ,  $t = 1.7$ ,  $k = 2$ ) are introduced into equation (3) we find the permeation constant 0.43 cm/hour.

---

<sup>1</sup> The original 1.6 molar concentration was reduced to 0.8 during the introductory period of washing.

The rate of water elimination was therefore in PALVAS experiments certainly not more than 40 % of my value for heavy water. It might be assumed that the cells studied by PALVA were less permeable than mine, but it is much more probable that the difference is due to the necessary omission of mixing the solutions used in PALVAS experiments, a source of error which is mentioned by the author, but not considered quantitatively or allowed for.

It appears doubtful whether a valid comparison can be made between an osmotic flow of water and the diffusion of single water molecules, and this doubt applies to all determinations made by means of osmotic methods, even when technically perfect, and it should perhaps be pointed out that generally they are not technically perfect, especially when the object contains several layers of cells.

In the present paper the permeation of DHO is studied as a diffusion process pure and simple, so that the permeation constants both for DHO and for methyl alcohol can be directly compared with those for more slowly permeating substances. They can be included in the permeability series on *Tolypellosis* (WARTIOVAARA 1942) as shown in table 5.

Table 5.

The permeability series for *Tolypellosis* at 20°, cm/h. (From WARTIOVAARA 1942, except DHO and methyl alcohol).

	Living cells	Protoplasmic membrane
DHO .....	1.0	1.6
Methyl alcohol .....	0.85	1.7
Urethylan .....	0.42	0.75
Trimethyl citrate .....	0.044	0.050
2, 3-Butyleneglycol .....	0.016	—
Ethyleneglycol .....	0.010	—
Urea .....	0.00084	—
Hexamethylentetramine .....	0.00055	—
Tetraethyleneglycol .....	0.00051	—
Glycerol .....	0.000081	—

This series, based on direct determinations of permeating quantities of the single substances, covers P values over a range of 10<sup>5</sup>, from that of glycerol to those of heavy water and methyl alcohol. Since such a series is not available for any other plant<sup>1</sup> it seems justified to attempt a numerical evaluation of the results.

<sup>1</sup> HÖFLER published in 1934 a permeability series on *Majanthemum*, also including water, but the errors inherent in the plasmolytic method, especially

As shown by COLLANDER and BÄRLUND (1933) in the case of *Chara* the permeation rates of most anelectrolytes is almost directly proportional to their solubility in lipoids. Only those compounds the molecular size of which is below a certain limit ( $MR_D \leq 15$ ) show a definitely higher rate than corresponding to their lipid-solubility. That *Tolyphelopsis* will show the same relations is to be expected, if only because of the close relationship to *Chara*.

Table 6.

The permeability series for *Tolyphelopsis*, arranged according to increasing molecular volume of the substances included.  $P$  the permeability constant,  $k$  the distribution ratio for ether/water (after COLLANDER and BÄRLUND 1933 and WARTIOVAARA 1942).  $MR_D$  the molecular refraction.

	$P$	$k$	$P/k$	$MR_D$
DHO .....	1.6	0.018	89	3.7
Methyl alcohol .....	1.7	0.27	5.1	8.3
Urea .....	0.00084	0.00047	1.8	13.7
Ethyleneglycol .....	0.010	0.0048	2.1	14.4
Urethylan .....	0.78	0.43	5.4	16.5
Glycerol .....	0.000081	0.00074	0.11	20.6
Butyleneglycol .....	0.016	0.029	0.55	23.7
Hexamethylentetramine	0.00055	0.00026	2.1	38.8
Tetraethyleneglycol .....	0.00051	0.0024	0.21	47.1
Trimethyl citrate.....	0.050	0.43	0.12	50.3

For *Tolyphelopsis* it is now possible, however, to estimate the diffusion resistance of the isolated protoplast even for substances which permeate very rapidly. This makes it possible to estimate the influence of molecular size more accurately than in the case of *Chara*. If the permeation rate of the substances studied depended solely on their lipid-solubility — or rather on their distribution ratio between ethylether and water, which has been selected as a measure of lipid solubility — we should in table 6 find the relation  $\frac{P}{k}$  constant,  $P$  being the permeation constant and  $k$  the distribution ratio ether/water. (This ratio for DHO is given below). This relation is in fact of the same order of magnitude (viz. 0.1 to 0.6)<sup>1</sup> for those compounds which have molecular refractions  $MR_D \leq 21$ .

For the smaller molecules ( $MR_D = 8-17$ ) the relation  $\frac{P}{k}$  is about ten times higher and for the smallest, heavy water ( $MR_D$  about 3.7), a few hundred times higher. Substances which have molecular refractions  $MR_D \geq 21$ , as regards rapidly permeating substances, must be suspected to have seriously influenced the experimental results.

<sup>1</sup> Only hexamethylentetramine behaves abnormally in this as in other respects.

dred times higher. Closer relations between the permeation ability and the physical constants used (somewhat arbitrarily) for comparison could probably only be expected for very nearly related compounds (within homologous series) and at present we cannot do more than point out the relation in order of magnitude between what is called permeation through pores and the molecular volume as expressed by the molecular refraction.

The distribution ratio for DHO as given in table 6 was not directly determined, but arrived at in the following way. When shaken together at 20° ether and ordinary water will separate into a water phase containing about 95 g and an ether phase containing 1.7 g water per 100 ml. A content (not too large) of DHO is assumed to become distributed in the same way, and the distribution ratio will thus be  $1.7/95 = 0.018$ . This treatment of the problem is in formal agreement with that adopted for other anelectrolytes when the molecules of DHO are considered as dissolved, but it is by no means clear that the result is of the same significance from a physiological point of view. The distribution ratio for water depends directly on its absolute solubility in ether which is not the case regarding other distribution ratios. On the other hand we have to remember that the determination of distribution ratios represents only a model in which the ether phase represents the lipoids of the plasma membrane. Also in the physiological conditions represented it seems natural to assume that the possibility for water to penetrate the membrane by »solution» in its lipoids is limited by the absolute solubility, while that of other anelectrolytes, present in dilute solutions, is governed by the distribution ratio lipid/water. The distribution ratio as calculated for heavy water appears therefore also physiologically plausible.

As evident from table 6 there is a very large interval between the  $\frac{P}{k}$  value for heavy water and that for the next substance, methyl alcohol. It will probably be difficult to fill up this interval. Such compounds as CO, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> or perhaps even CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> are to be considered, but it will be difficult to obtain accurate determinations of plasma permeability with any of them. It is, nevertheless, probable that the »pore permeability» increases regularly with decreasing molecular volume and finally becomes much more important than the »solution permeability». The enormous permeation ability of heavy water as compared with its slight solubility in lipoids is therefore probably no real exception from a general rule. The exceptional position of water is probably apparent only and due to the fact that we have so far no other substance, with similar small lipid solubility and small molecular volume, for which the permeation rate has been determined with similar accuracy.

### Summary.

A method is described for direct determination of the permeation constant of very rapidly permeating substances into single large plant cells. This method is available also for heavy water and allows the determination of its permeation as a diffusion process.

On internodal cells of *Tolyphelopsis stelligera* (Characeae), both in the living state and freshly killed, the permeation constants of heavy water and methyl alcohol were determined, and from these determinations the diffusion resistance of the isolated living protoplast calculated.

The following permeation constants were obtained: For DHO on living cells 1.04, killed cells 3.03, isolated protoplasts 1.8, for methyl alcohol on living cells 0.85, killed cells 1.75, isolated protoplasts 1.7. (The permeability for methyl alcohol remained the same between alcohol concentrations of 0.8 to 0.08 molar). The permeation rate of ordinary water is higher than that of DHO, but the difference is probably slight.

The permeability series for the protoplasts of *Tolyphelopsis* as now supplemented with the ratio for DHO and methyl alcohol are discussed. The permeation rate for heavy water is several hundred times higher than those for substances of the same relative solubility in ether, but much larger molecular volumes, while methyl alcohol does not differ significantly from other molecules of relatively small size ( $MR_D \approx 17$ ) which on an average permeate 10 times more rapidly than the larger ones showing a similar solubility in ether.

I wish to thank the chief of the Zoophysiological Laboratory of Copenhagen University professor A. KROGH most heartily for the opportunity to do this piece of work and for his help and support, freely given in many instances. I am very grateful for a grant from the RASK-ØRSTED FOUNDATION which made this study financially possible. Some final experiments were carried out in the Botanical Institute of the University of Helsinki, towards which I received a grant from the FINNISH ACADEMY OF SCIENCE. I wish to thank also professor RUNAR COLLANDER for valuable help and counsel.

## Literature.

BACHMANN, F., 1939. Zur Analyse von Permeabilitätsmessungen. I. Wasserpermeabilität. *Planta* 30, 224—251.

BROOKS, S. C., 1935, The permeability of erythrocytes to deuterium oxide (heavy water). *Journ. Cell. Comp. Physiol.* 7, 163—171.

—»— 1937, Osmotic effects of deuterium oxide (heavy water) on living cells. *Science* 86, 497—498.

COLLANDER, R. und BÄRLUND, H., 1933, Permeabilitätsstudien an *Chara cerasophylla*. II. Die Permeabilität für Nichtelektrolyte. *Acta Bot. Fenn.* 11, 1—114.

FREY-WYSSLING, A. und v. RECHENBERG-ERNST, V., 1943, Über die Wasserpermeabilität der Epithemzellen von Hydathoden. *Flora*, N.F. 37, 193—215.

HÖFLER, K., 1934, Permeabilitätsstudien an Stengelzellen von *Majanthemum bifolium* (Zur Kenntnis spezifischer Permeabilitätsreihen. I.). *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-nat. Klasse, I. Abt.*, 143, 213—264.

PALVA, P., 1939, Die Wasserpermeabilität der Zellen von *Tolypellopsis stelligera*. *Protoplasma* 32, 265—271.

PARPART, A. K., 1935, The permeability of the mammalian erythrocyte to deuterium oxide (heavy water). *Journ. Cell. Comp. Physiol.* 7, 153—162.

WARTIOVAARA, V., 1942, Über die Temperaturabhängigkeit der Protoplasma-permeabilität. *Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. Vanamo* 16, n:o 1, S. 1—111.





ACTA BOTANICA FENNICA 35  
EDIDIT  
SOCIETAS PRO FAUNA ET FLORA FENNICA

ON THE ABSORPTION OF LEAD INTO THE  
CELLS OF NITELLA

BY

AGNES WERNSTEDT

FROM THE LABORATORY OF ZOOPHYSIOLOGY, THE UNIVERSITY OF COPENHAGEN

HELSINGFORS 1944

PRINTED BY  
OY. TILGMANN AB. HELSINKI 1944

## Introduction.

COLLANDER has shown in several papers on *Chara ceratophylla* (Wallr.) and other characeae that the concentration of ions in the cell sap is greatly in excess of that found in the water of the habitat.

According to COLLANDER (1930) the leaf cells of *Ch. ceratophylla* contain up to 40  $\mu$ l sap, which is easily got out in a pure state, and they are therefore well suited for permeability determinations in which the substances permeating can be determined analytically. In the paper quoted the normal composition of the sap was determined and compared with the water of the natural habitat (4—5 % saline).

All the ions determined were found in the sap in higher concentration than in the surrounding water. The total salinity of the sap amounted to about 15 %. Since the sap contains very little protein (< 1 %) or other organic compounds (< 3 %) the ions cannot be organically combined, as is borne out also by the high electric conductivity. By means of a compensation dialysis it was shown further that the mud, from which the plants are assumed to absorb part of their nutritional substances, exhibited much lower concentrations of salt than the sap. It is evident therefore that the salts are transported from a dilute external solution towards a more concentrated internal. In later papers (36, 39) COLLANDER turns more and more to the view that the ions are actively absorbed by the cells by a special «adenoid» mechanism. The process requires the expenditure of energy on the part of the plants.

In an attempt to elucidate the mechanism of the active absorption BROOKS (1938) observed on *Nitella* that radio-potassium ( $^{42}\text{K}$ ) was for some hours during the transport concentrated within the protoplasm.

MULLINS (42) continuing the work of BROOKS examined whether the very numerous granules in the protoplasm of *Nitella* could have anything to do with absorption of ions. He placed cells in 10 millimolar KCl (containing  $^{42}\text{K}$ ) and centrifuged them after a suitable period during a suitably varied time and at varying rates. As the granules have a higher specific gravity he got them massed together in the lower parts of the cells. After centrifuging he counted the activity of the upper and lower halves of the cells

separately and found that the active potassium was to a certain extent concentrated within the granules.

My experiments serve as a control and extension of the observations of MULLINS. I worked with radio-lead (Thorium-B, atomic weight 212, half life 10.6 hours). This isotope was studied by HEVESY and PANETH (quoted from *A Manual of Radioactivity* 1938) who showed that a chemical separation between the isotope and ordinary lead is impossible. They are chemically identical. Cells have a very considerable affinity to lead and the activity which corresponds to less than  $10^{-10}$  gram-atom, can be measured with sufficient accuracy in a GEIGER-MÜLLER counter.

The active lead is obtained from a thorium preparation, placed in a small container below a negatively charged platinum foil. Gaseous thorium emanation is continually formed and attracted by the platinum on which it is transformed to  $^{212}\text{Pb}$ . A practically maximal quantity is reached in a little over 3 days when the rate of decay will become equal to the rate of formation. The lead is dissolved in n/10 HCl and neutralized afterwards with an equal amount of NaOH. The first experiments were made with the active lead alone, the later ones with a mixture of a certain amount of ordinary lead with this. In this way the relation between the measured activity and the corresponding quantity of lead could be defined.

The *Nitella* cells were found to be very suitable for these experiments. Single intermodal cells were isolated and could live on indefinitely. Cells of 70—100 mm length and about  $\frac{1}{2}$  mm diameter were selected. They were placed in narrow glass tubes sealed at one end ( $120 \times 4$  mm), and the outside fluid was kept mixed by airbubbles. During the experimental period samples were taken from the fluid by a Carlsberg pipette (vol. 11.56  $\mu\text{l}$ ), dried and counted. The GEIGER-MÜLLER counter employed in the laboratory is described by HILDE LEVI (1941) and by HOLM-JENSEN (1943). The countings per minute were corrected for counting error, zero effects and the natural loss as characterized by the half life period. Usually about 1000 impulses were counted giving a sufficient accuracy of about 3 %.

### Centrifugation Technique.

MULLINS centrifuged his cells for a long time (up to 8 hours) at a low speed. I found in a series of preliminary experiments that centrifuging for 7 to 10 min. at 3000/min. will give the most complete displacement of granules without any visible damage to the cells, which were centrifuged in the same tubes in which they were exposed to the experimental solutions. After centrifuging in this way the cells retained their turgor completely, and microscopic

observation showed an undisturbed distribution of protoplasm and chloroplasts and no change in the protoplasmic flow. A small precipitate, presumably granules, was visible for a short time at the lower end of the cell.

Centrifuging longer at the same rate brought a number of chloroplasts down and experiments with centrifuging at lower rates (2000/min.) caused the cells to die slowly without giving any effective precipitate of granules.

After centrifuging the cell is cut across, the cut surface touched with a narrow capillary tube and sap collected and weighed. The protoplasm is brought out by drawing the cell between two fingers exerting considerable pressure and is likewise collected in a capillary tube.

### Description of an Experiment.

The active lead is dissolved from the platinum electrode in 0.2 ml n/10 HCl and neutralized with 0.2 ml n/10 NaOH. The solution is transferred to an experiment tube and filled up with distilled water to 1.8 ml. After mixing by air an initial sample is taken by a Carlsberg pipette of 11.56  $\mu$ l. The sample is blown out into a counting dish and dried. Three living Nitella cells, 70—100 mm long, are put into the tube and samples taken at suitable intervals by means of the same pipette. In this case at 13<sup>30</sup>, 14<sup>30</sup>, 17<sup>00</sup> and finally at 19<sup>30</sup>. After the final sample the cells are centrifuged, cut and samples of sap, upper and lower protoplasm collected in capillary tubes. These are weighed, the contents blown out into counting dishes and the tubes again weighed to 0.1 mg.

In this case we have two samples of sap 3.9 mg and 6.0 mg, upper protoplasm 4.3 and 8.7 mg, lower 4.5 and 8.5 mg. The countings corrected as above gave the following results in impulses /min./ 11.56  $\mu$ l.

Initial sample .....	1 680
13 <sup>30</sup> cells put in .....	414
14 <sup>30</sup> .....	36
17 <sup>00</sup> .....	45
19 <sup>30</sup> .....	51

	Centrifuged	
	7 min.	15 min.
Sap .....	26	19
Upper protoplasm .....	365	400
Lower » .....	1 000	795

The experiment shows that lead disappears rapidly from the bathing fluid and is to some extent concentrated in the protoplasm while only a little

penetrates into the sap. Apparently the lead is preferentially absorbed by the granules, since the protoplasm from the lower end of the cell contains after centrifuging 67 to 73 % of the whole.

The values for the sap may become too high and for the protoplasm too low on account of the difficulties inherent in a complete separation of the two.

Three similar experiments gave for the protoplasm from the lower half of the cells, 66 %, 73 % and 55 %.

Three control experiments in which no centrifugation was made showed the following accidental distributions 51 %, 61 % and 57 % for the halves containing the highest activity.

In order to determine absolute quantities of lead experiments were made with mixtures of known amounts of lead acetate and radiolead, and for these it was necessary to determine the lead concentrations which would not damage the cells.

A number of isolated Nitella cells were distributed into 5 test tubes containing increasing concentrations of lead acetate namely: distilled water, 0.001, 0.01, 0.1 and 1 millimole respectively. In the lowest concentrations including 0.01 mM the cells could live for more than 10 days. In 0.1 mM they died in 5 days and in 1 mM in two days.

An experiment was made with 1.8 ml 0.1 mM  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  to which was added 0.4 ml active lead solution.

12 <sup>00</sup> Initial sample .....	2 370 imp./min.	11.56 $\mu\text{l}$
12 <sup>20</sup> cells put in .....	62	
13 <sup>45</sup> .....	46	
14 <sup>30</sup> .....	47	
17 .....	26	
21 final sample .....	17	
sap .....	27	
Protoplasm from upper half .....	265	
»     »     lower   » .....	546	

The quantities of lead are calculated as follows. The number of impulses corresponding to the total quantity of lead added is  $\frac{2370}{11.56} = 2200$  = 451000/min. representing 0.18 micromole ( $\mu\text{M}$ ). 1000 impulses correspond therefore to

$$\frac{1800}{451} \times 10^{-4} = 4.0 \times 10^{-4} \mu\text{M lead.}$$

Allowing for the samples taken out the final quantity of lead in the bathing fluid works out as

$$\frac{17.3 \times 2180}{11.56} = 3270 \text{ impulses or } 13 \times 10^{-4} \mu\text{M lead.}$$

For the total quantity of sap in the 6 cells experimented on we have

$$\frac{27 \times 48}{11.56} = 112 \text{ impulses or } 0.45 \times 10^{-4} \mu\text{M lead.}$$

The protoplasm from the upper halves of the cells gives

$$\frac{265 \times 12}{11.56} = 276 \text{ impulses or } 1.1 \times 10^{-4} \mu\text{M lead and the protoplasm from}$$

the lower halves

$$\frac{546 \times 12}{11.56} = 568 \text{ impulses or } 2.25 \times 10^{-4} \mu\text{M lead.}$$

The total quantities of protoplasm and sap were made out by weighing 10 cells and separating plasma and sap in capillary tubes. The results were:

10 cells with an average length of 70 mm weigh .....	170 mg
The protoplasm from them .....	40 mg
The sap       »     » .....	80 mg

Of the lead originally present 99 % have disappeared and special experiments showed that almost the whole of this was adsorbed to the cells.

The percentage distribution of the lead between upper and lower protoplasm was in this case 33—67 %; in two further experiments the results were 40—60 % and 30—70 %.

### Summary.

The experiments support the assumption that the granules may represent a link in the mechanism for ion absorption from the external fluid and hold the ions temporarily combined.

### Literature.

BROOKS, S. C., 1938, The penetration of radioactive potassium chloride into living cells. *J. of cell. a. comp. physiol.* **11**, 247—252.  
 COLLANDER, RUNAR, 1930, Permeabilitätsstudien an Chara ceratophylla. *Acta Botanica Fennica*, **6**, 1—18.  
 —»— 1936, Der Zellsaft der Characeen. »*Protoplasma*«, **25**, 201—210.  
 —»— 1939, Permeabilitätsstudien an Characeen. III. Die Aufnahme und Abgabe von Kationen. »*Protoplasma*«, **33**, 215—257.

HEVESY and PANETH, 1938, A Manual of Radioactivity. London.

HOLM-JENSEN, IB, 1943, A Method of Correcting for Counting Losses in *Geiger-Müller* Counters with Special Reference to the *Geiger-Müller* Counter Arrangement Described by *Hilde Levi* (1941). *Acta physiol. Scand.* 5, 271—276.

LEVI, HILDE, 1941, A *Geiger* Counter Arrangement Applied to Measurements of Radioactive Indicators in Biological Research. *Acta physiol. Scand.* 2, 311—323.

LEVY, MILTON, 1935, A Micro Kjeldahl Estimation. *Comptes Rendus Carlsberg, Sér. Chemie* 21 Nr. 1.

MULLINS, LORIN I., 1940, Radioactive Ion Distribution in Protoplasmic Granules. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.* 45, 856—858.

ACTA BOTANICA FENNICA 36  
EDIDIT  
SOCIETAS PRO FAUNA ET FLORA FENNICA

SOME EXPERIMENTS ON THE EXCHANGE  
OF POTASSIUM AND SODIUM BETWEEN  
SINGLE CELLS OF CHARACEAE AND THE  
BATHING FLUID

BY  
IB HOLM-JENSEN, AUGUST KROGH  
AND  
VEIJO WARTIOVAARA

FROM THE LABORATORY OF ZOOPHYSIOLOGY, COPENHAGEN UNIVERSITY

HELSINGFORSIAE 1944

PRINTED BY  
OY TILGMANN AB, HELSINKI 1944

## Introduction.

The experiments to be described in the following were undertaken on the joint initiative of professor R. COLLANDER and A. K. as a continuation of the work of COLLANDER and collaborators on permeability problems in *Characeae*. As they could only be made by means of radioactive isotopes it was decided to carry them out in Copenhagen and to utilize the cyclotron of the Institute for Theoretical Physics to obtain the active preparations<sup>1)</sup>. Dr. WARTIOVAARA came to Copenhagen in Sept. 1942 and brought with him a supply of *Tolyphelopsis*, but unfortunately the cyclotron failed at the time, and the experiments desired could not be made during W.s stay. However, so much was done and the technique was so far perfected by him that he should be counted one of the authors, although he could not take part in the determinations finally carried out in the winter of 1943/44. They were begun in the autumn, but had to be suspended during December and January owing to the seizure of the Institute for Theoretical Physics. When they could again be made the cell material available was rather limited and was supplemented with cells of *Nitella* obtained from the Botanical Institute of Stockholms Högskola by the kindness of professor STÅLFELT.

COLLANDER (1939) showed by spectrographic analysis of the cell sap and outside solution in different experimental conditions that the permeability of *Chara* and *Tolyphelopsis* cells for kations is very low, 1 millionth or less of the amount which would diffuse through a corresponding layer of water ( $5\mu$  thick), but his results were complicated by the active ion absorption going on, and it was impossible to distinguish with any certainty between these two processes. COLLANDER found for instance that lithium would be absorbed by *Chara* cells from an otherwise normal bathing fluid, containing 1 mM lithium, so that the Li-concentration in the sap would exceed the outside after two days and go on increasing for at least a fortnight to more than 5 mM. When such cells were put into a Li-free solution no measurable amount of Li would come out during two days. There can be little doubt that in this case the Li uptake was an active process.

<sup>1)</sup> We are extremely grateful for the kindness shown us by the personnel working the cyclotron who placed extremely active preparations of  $^{24}\text{Na}$  and  $^{42}\text{K}$  at our disposal.

When radioactive isotopes are used we have to do with atoms which are chemically identical with the normal atoms of the element in question, but are «labeled» by their radioactivity. The isotopes of Na and K used are quite unstable having a half-life of 15.5 and 13.5 hours, respectively, as found in our experiments. By the spontaneous splitting of the atom nuclei rays are emitted which can be utilized in a GEIGER-counter (HILDE LEVI 1941, I. HOLM-JENSEN 1943) to estimate the relative amounts of activity present in known volumes of solution. When an infinitesimal amount of, say,  $^{42}\text{K}$  is added to a certain volume of a bathing fluid containing, say, 1 mM of K we look upon the whole of the K present as labeled. A definite sample of it will give a definite count (decreasing of course with time at a certain rate), and when potassium penetrates into a cell placed in the fluid the counting of a sample of the sap will measure the amount of exchange with the potassium of the bathing fluid. When we have cells (containing, say, 100 mM K in the sap) which have been for a long time in a fluid of a certain composition (e. g. K content 1 mM) we assume a steady state to have been reached, so that in unit time just so much K is absorbed (mainly actively) from the bathing fluid as diffuses out from the sap of the cells. On this assumption it becomes possible by measuring the rate of uptake of  $^{42}\text{K}$  to estimate the rate of diffusion of K through the protoplasmic membranes and consequently the permeability of these.

### Material and methods.

The experiments were made on isolated cells from the stems of *Tolyptelopsis stelligera* and *Nitella* sp. usually between 50 and 100 mm long with diameters of 0.6 — 0.9 mm in the case of *Tol.* and 0.5 — 0.7 mm in *Nitella*. Cells were placed either singly in paraffined tubes containing a small measured volume of experimental fluid or in groups in larger vessels containing so much that the changes in outside concentration could be disregarded. The containers were either stoppered or placed in a moist chamber, a box in which the air was kept saturated with water vapour. When a cell had to be analysed it was taken out of the experimental solution and usually washed thrice for one minute in each of 3 vessels with 50 ml of the same solution without activity. The turgor was ascertained, the diameter measured to 0.01 mm, adhering fluid removed, and the cell fixed by means of a lump of plasticine in a somewhat shorter glass tube so that a few mm of one end would protrude. In the later experiment these manipulations were carried out in a moist chamber into which the hands of the operator could be introduced through rubber cuffs, so that no fluid could be lost by evaporation. WARTIOVAARA had shown that the best way to obtain sap was to utilize centrifugal force. We accor-

dingly arranged a small hand centrifuge with a horizontal wooden bar on which the tube containing the cell could be clamped so that the free end of the cell at a distance of 14 cm from the axis was just inside the opening of a small sampling vessel. In this position the cell was either pricked by a fine needle (*Tol.*) or the end cut off (*Nit.*) and the sap driven off by centrifugation for a few seconds at about 300 revolutions/min. In the final series of experiments samples of protoplasm were next secured, after cutting off the end of the cell, in another sampling vessel by centrifugation for about 1 minute at about 1000/min. The sap obtained by these procedures is practically always free from chlorophyll, but the protoplasm contains an admixture of sap, and the outer layer containing most of the chloroplasts remains adhering to the cellulose wall. The quantities of sap and protoplasm secured were determined by weighing the sampling tubes. In almost all cases there would be enough sap from a single cell for a sample of about 10  $\mu\text{l}$  to be taken by means of a Carlsberg micropipette (MILTON LEVY 1936), placed in a counting dish and evaporated to dryness by exposure to radiating heat from an incandescent lamp as described by G. BIILMANN (1938 p. 10). The protoplasm, usually combined from two cells and amounting to 2—4  $\mu\text{l}$  from each, was transferred quantitatively by washing to a similar counting dish and likewise dried.

Representative samples of sap were analysed for potassium by the method described by KROGH (1943, 1944) and for total kations by conductivity determinations.

These determinations were carried out in a small vessel, containing 1 ml of distilled water. The sample to be analysed, usually about 5  $\mu\text{l}$ , was added and the conductivity between two platinated electrodes (each about 0.6  $\text{cm}^2$  with a distance of 0.8 cm) was measured by means of a Wheatstone-bridge arrangement (Philip Philoscope) using alternating current of 2 volts and 1000 Hz.

The conductivity was expressed by the concentration of KCl showing the same conductivity. From this figure the actual K concentration as found by the analysis was subtracted. The rest was corrected for Ca and Mg according to COLLANDERS analyses and recalculated as NaCl. This procedure is quite rough, but, as it turns out, sufficient for our purposes. We have assumed that the ionic composition of the protoplasm is identical with that of the sap and in a single case found it confirmed by analyses. As our supply of cells was rather small we could not do more. While the sap could be precipitated directly with platinum chloride the protoplasm of course had to be ashed in a platinum boat. Determinations accurate to about 2 % could be made on 10—20  $\mu\text{l}$ .

### The calculation of experiments.

We assume a concentration of the ion in question, the same in the sap of all the cells studied and remaining constant throughout the experimental period. A certain fraction, proportional to the concentration in mM ( $C_s$ ), the surface area (in  $\text{cm}^2$ ) and the time (hours), diffuses out through the protoplasmic membranes and is replaced by ions taken up (mainly by adenoid activity) from the bathing fluid. These ions are labeled by the radioactive isotope. By counting the activity of a unit volume of sap ( $a_s$ ) and of outside fluid

( $a_o$ ) we get the relation  $\frac{a_s}{a_o}$ .

In analogy with the earlier studies (COLLANDER 1933, WARTIOVAARA 1944) we have the permeation constant

$$k = 0.576 \frac{d}{t} \log_{10} \frac{C_s}{C_s - C_o \frac{a_s}{a_o}}$$

expressed in  $\text{cm}/\text{hour}$  and corresponding to the volume in  $\text{ml}$  of the inside solution diffusing out through 1  $\text{sq.cm.}$  of the protoplasmic membranes in 1 hour.

The activity of the protoplasm is in nearly all our determinations higher than in the sap, but a certain admixture of sap has to be allowed for. As shown below the cytoplasm volume of the cell in question can be calculated from a determination of the cell surface and the average thickness of the layer. This volume ( $p$ ) is subtracted from the actual volume of »protoplasm» obtained ( $P$ ) giving the sap mixed into it

$$P - p = s$$

and

$$P \cdot a_P - s a_s = p a_p$$

from which the activity of the unmixed protoplasm ( $a_p$ ) is calculated.

When the activities of both sap and protoplasm are determined, we can, neglecting the diffusion resistance of the protoplasm itself, determine the diffusion resistance for each of the two membranes separating the protoplasm layer from the sap ( $R_i$ ) and the bathing fluid ( $R_o$ ), respectively.

The computation is carried out from the following differential equations.

$$- v_s \cdot \frac{d C_{si}}{dt} = k_i (C_{si} - C_{pi}) \quad (\text{I})$$

$$v_p \cdot \frac{d C_{pi}}{dt} = k_i (C_{si} - C_{pi}) - k_o \cdot C_{pi} \quad (\text{II})$$

in which  $v_s$  is the volume of the sap and  $v_p$  that of the protoplasm,  $C_{si}$  and  $C_{pi}$  represent the concentrations of the radioinactive ions in question in the

sap and protoplasm.  $k_i$  is the diffusion coefficient of the inner and  $k_o$  of the outer membrane.

For  $\lim. v_p = 0$  we get from II

$$(II\ a) \quad k_i (C_{si} - C_{pi}) = k_o \cdot C_{pi} \text{ or } \frac{k_o}{k_i} = \frac{C_{si} - C_{pi}}{C_{pi}} \quad (II\ b)$$

In order to obtain an idea of the degree of approximation involved in II a we must solve equations I and II<sup>1</sup>.

Taking  $C_s = C_p$  we assume that  $C_{si}$  and  $C_{pi}$  may be expressed by the following series

$$C_{si} = C_s \sum a_i \cdot e^{-\beta_i t}$$

$$C_{pi} = C_p \sum \delta_i \cdot e^{-\beta_i t}$$

By inserting these expressions for  $C_{si}$  and  $C_{pi}$  in (I) and (II) we get the following complete solution of (I) and (II)

$$C_{si} = C_s (a_1 \cdot e^{-\beta_1 t} + a_2 \cdot e^{-\beta_2 t}) \quad (III)$$

$$C_{pi} = C_p (\delta_1 \cdot e^{-\beta_1 t} + \delta_2 \cdot e^{-\beta_2 t}) \quad (IV)$$

where

$$\beta_1 = \frac{k_i \cdot v_s + k_i \cdot v_p + k_o \cdot v_s}{2v_s v_p} + \sqrt{\left(\frac{k_i v_p + k_i v_s + k_o v_s}{2v_s v_p}\right)^2 - \frac{4k_i \cdot k_o}{v_s v_p}}$$

$$\beta_2 = \frac{k_i \cdot v_s + k_i \cdot v_p + k_o \cdot v_s}{2v_s v_p} - \sqrt{\left(\frac{k_i v_p + k_i v_s + k_o v_s}{2v_s v_p}\right)^2 - \frac{4k_i \cdot k_o}{v_s v_p}}$$

$$a_1 = \frac{\beta_2}{\beta_2 - \beta_1}; \quad a_2 = \frac{\beta_1}{\beta_1 - \beta_2};$$

$$\delta_1 = a_1 (1 - \frac{k_i}{v_s} \cdot \beta_1) \text{ and } \delta_2 = a_2 (1 - \frac{k_i}{v_s} \cdot \beta_2)$$

It is readily realized that with increasing  $t$ , we will reach a value  $T$  which will permit the links containing  $\beta_1$  in III and IV to be neglected.

For  $t \geq T$  we have

$$C_{si} = C_s \cdot a_2 \cdot e^{-\beta_2 t} \quad (V)$$

$$C_{pi} = C_p \cdot \delta_2 \cdot e^{-\beta_2 t} \quad (VI)$$

inserting these in II b we get

$$\frac{k_o}{k_i} = \frac{a_2 - \delta_2}{\delta_2} = \text{Konst.}$$

<sup>1</sup> We are greatly indebted to professor LINDERSTRØM-LANG for suggesting to us the method of solution adopted. (Compare LINDERSTRØM-LANG 1942).

It is readily realized from computations based on a few sets of arbitrary data similar to those found in our experiments, that the value of  $\frac{a_2 - \delta_2}{\delta_2}$  is practically equal to the real ratio  $\frac{k_o}{k_i}$ . In this way it is also seen that when  $t < T$  we will find  $\frac{k_o}{k_i}$  too small. In all our experiments  $T \leq 24$  h.

For application to our experiments (II b) is written

$$\frac{k_o}{k_i} = \frac{(C_s - C_o \frac{a_s}{a_o}) - (C_p - C_o \frac{a_p}{a_o})}{C_p - C_o \frac{a_p}{a_o}}$$

(because  $C_s = C_p$  must always be equal to the sum of inactive and active ions of the element studied).

$$\frac{k_o}{k_i} = \frac{C_o (\frac{a_p}{a_o} - \frac{a_s}{a_o})}{C_p - C_o \frac{a_p}{a_o}}$$

Since the last link of the denominator is in our experiments small compared with  $C_p$  we can use the convenient expression

$$\frac{k_o}{k_i} = \frac{C_o}{C_p} (\frac{a_p}{a_o} - \frac{a_s}{a_o})$$

As the resistance of the two membranes against the diffusion processes  $R_i$  and  $R_o$  may be expressed by  $\frac{1}{k_i}$  and  $\frac{1}{k_o}$  we have

$$\frac{R_i}{R_o} = \frac{k_o}{k_i} = \frac{C_o}{C_p} (\frac{a_p}{a_o} - \frac{a_s}{a_o}) \quad (\text{VII})$$

A small number of *Tolyphelopsis* cells have been carefully measured as follows.

The length, exclusive of the ends with the attached small cells, directly on a mm scale. The diameter in micrometer units under the microscope and recalculated in mm. The cell was weighed in a tube. The sap driven off and weighed and thereupon the protoplasm. The cut ends were weighed and the cell wall dried and weighed. The results are given in table 1.

There is a satisfactory agreement between the volumes as calculated from the measured diameters and lengths and the weights. The sap obtained in this way is practically pure, and its quantity a fairly constant proportion of the total, but some sap remains and is driven off with the protoplasm, and

Table 1.  
*Tolyphelopsis* cells.

1	2	3	4	5	6	7		8
Length mm	Dia- meter mm	Vol. $\mu$ l.	Weight — ends mg	Sap mg	Proto- plasm mg	Cellulose wall		5/4 % Sap
						as dif- ference mg	dry mg	
80	0.895	50.7	50.5	38.4	6.4	5.7	1.7	76
75	0.74	32.4	31.5	24.0	4.2	3.8	1.2	76
73	0.762	38.6	39.3	31.6	4.0	3.7	1.2	81
57	0.733	24.2	24.0	16.6	4.2	3.2	1.0	69

some protoplasm containing the large majority of the chloroplasts remains adhering to the cell wall.

N. ANDRESEN, M. Sc. at the Carlsberg laboratory very kindly undertook some measurements on living cells both of *Tolyphelopsis* and *Nitella* to determine the thickness of the protoplasmic layer, with the following results, extracted from his report.

The cells were examined through a water immersion lens magnifying 40 diameters and having a focal depth of 2  $\mu$ . The eyepiece magnified 15 times. Different impurities especially small algae were seen adhering to the surface. The thickness of the cellulose wall could not be ascertained. A fixed layer of chloroplasts was observed immediately below the adhering impurities. These had a horizontal diameter about 10  $\mu$  and a vertical height of 4—6  $\mu$ . The chloroplasts were so closely packed in *Tolyphelopsis* that their circumference was polygonal.

The microscope was now focused on the under surface of the chloroplast layer and the position of the micrometer screw noted. Below this was a flowing cytoplasm filled with granules. In *Nitella* there were free chloroplasts and colourless granules of 1—5  $\mu$  diameter. In *Tolyphelopsis* there were in addition bluegreen, more or less spherical bodies of 5—10  $\mu$  and flakes with a diameter up to 50  $\mu$  and about 10  $\mu$  thick. The microscope was lowered to the point when no more granules appeared by further lowering. In this position it was kept for about 5 minutes, and each time a larger indistinct granule passed the field of vision it was ascertained by raising and lowering the microscope whether it was above or below the focal plane adopted. If it was found below, the microscope was lowered accordingly and the final position noted.

This would give a maximum value for the cytoplasm thickness at the place examined. Such measurements were made near the ends and about the middle of each cell.

The variations in thickness observed within the single cells were small, and it was seen that the large inclusions in *Tolyphelopsis* when followed over considerable distances would collide all the time with the fixed chloroplasts and fill up the cytoplasm to the lower boundary.

The measured thickness must be corrected for the focal depth, which is calculated and empirically measured to 2  $\mu$ . At the highest position of the microscope this will be 2  $\mu$  above the lower surface of the fixed chloroplasts, and at the lowest it will be 2  $\mu$  below the lowest visible granule. The correction to be subtracted is therefore 4  $\mu$ . As this happens to be also the thickness of the chloroplast layer we have accepted the figures as they stand as representing the total thickness of the protoplasmic layer.

The results are as follows.

Table 2.

<i>Nitella.</i>			<i>Tolyphelopsis.</i>		
Cell I.	3 cm long.		Cell I.	2 cm long.	
	10 $\mu$	One end		15 $\mu$	
	10 »	Middle		13 »	
	10 »	Other end		15 »	
Cell II.	3 cm long.		Cell II.	3 cm long.	
	13 $\mu$			11 $\mu$	
	15 »			10 »	
	15 »			10 »	
Cell III.	6 cm long.		Cell III.	1.5 cm long.	
	12 $\mu$			15 $\mu$	
	10 »			18 »	
	10 »			15 »	
Cell IV.	2 cm long.		Cell IV.	1 cm long.	
	15 $\mu$			15 $\mu$	
	15 »			15 »	
	(25 » Very irregular scarcely reliable)			15 »	
Cell V.	3 cm long.		Cell V.	2 cm long.	
	15 $\mu$			12 $\mu$	
	14 »			13 »	
	15 »			12 »	

The average thickness for *Nitella* is 13  $\mu$  and for *Tolyphelopsis* 13.5  $\mu$ .

COLLANDER (1930) puts the thickness of the protoplasm at 5  $\mu$ , but his determinations were made on fixed material and on another species, *Chara ceratophylla*.

Utilizing the figure  $13.5 \mu$  for the *Tolypellopsis* cells in table 1 we calculate the protoplasm volumes given in table 3.

Table 3.  
*Tolypellopsis* cells from table 1.

1	2	3	4	5	6	7	8
Length mm	Dia- meter mm	Surface cm <sup>2</sup>	Pl. vol. μl.	Chloro- plast layer μl.	Cytopl. μl.	Sap corrected μl.	% Sap
80	0.895	2.24	3.0	0.9	2.1	42.7	85
75	0.74	1.74	2.4	0.7	1.7	26.5	84
73	0.765	1.75	2.4	0.7	1.7	33.9	86
57	0.733	1.31	1.8	0.5	1.3	19.5	81

When the calculated cytoplasm volumes are subtracted from the plasma volumes given in table 1 the difference is sap and in column 7 this is added to the sap obtained by centrifugation.

We have analysed cell sap and protoplasm from 6 cells kept for about 11 weeks in 5 % ocean water containing 25 mM Na and 0.5 mM K. Sap was taken from each cell separately while the protoplasm from all was combined and ashed. K and conductivity were determined on each sample of sap. The results were:

Table 4.  
Analysis of *Tolypellopsis* cells.

1	2	3	4	5	6
Cell	Sap mg	Protopl. mg	Kations <sup>1</sup> mM	K mM	Col. 4-Col. 5 mM
1	24.0	1.5	272	230	42
2	21.7	2.3	272	230	42
3	20.8	4.8	256	164	92
4	20.7	lost	258	200	58
5	16.9	2.4	lost	(178)	
6	17.0	5.9	286	177	109
Average:			269	200	69

<sup>1</sup> Expressed by the KCl concentration showing the same conductivity.

The 16.9 mg protoplasm collected contained 0.66 mg dry substance of which 0.33 mg was ash. The ash was dissolved in 2 ml water and determinations of K and conductivity made. Calculated as dissolved in 16.2 mg water the results would correspond to a conductivity of 252 mM with 174 mM K. It is evident that the assumption, which it is necessary to make in the permeability determinations, viz. that the composition of the sap is the same in all the cells examined and remains constant, represents only a first approximation.

In order to observe the changes taking place when cells were exposed to solutions of varying composition and the rate of such changes the following experiment was made. Solutions were prepared by mixing 200 ml of a 4 % dilution of seawater with suitable combinations of 60 mM NaCl and 60 mM KCl to obtain the following concentrations in mM.

*Table 5.*  
Experimental solutions.

	1	2	3	4
K .....	0.2	1.0	5.0	25
Na .....	39.7	39.0	35.2	15
Ca .....	0.22	0.22	0.22	0.22
Mg .....	1.18	1.18	1.18	1.18

The total kation content of these is the same, but Na is progressively replaced by K.

A number of cells from the sea water dilution mentioned above were distributed in these solutions on Decbr. 21 and samples taken out for analyses on 27/12, 10/1 and 24/1. Usually 2 × 2 cells were taken each time, and 2 separate determinations made on the sap, while the protoplasm was combined from all 4 cells. Only two determinations on protoplasm could be made at each of the dates. In solutions 1 and 2 the cells kept well. In solutions 3 and 4 the cells showed increasing turgescence. On the 10/1 many had burst in solution 3, and only 1 was left alive in solution 4.

The average results are given in table 6.

Although the results are rather irregular there can be little doubt that in the solutions 1 and 2 the potassium concentration is gradually reduced while the total concentration is maintained. In the potassium rich solutions 3 and 4 potassium is taken up in excess and the total concentration rises, finally causing the cells to burst. It is to be remembered that the cells left for analysis are those which have shown the least reaction in this direction.

In a similar, but very incomplete, experiment begun early in Octb. a small number of cells were placed respectively in diluted sea water with a total

Table 6.

	Sap mM.			Protopl. mM.		
	Kation	K	Diff.	Kation	K	Diff.
K 0.2	21/12	269	200	69	252	174
	27/12	266	175	91		78
	10/1	248	155	93		
	24/1	252	143	109	229	112
K 1.0	21/12	269	200	69	252	174
	27/12	268	180	88	244	147
	10/1	250	161	89	185	99
	24/1	266	143	123	244	124
K 5	21/12	269	200	69	252	174
	27/12	284	218	66		78
	10/1	301	197	104	220	137
	24/1	269	200	69	252	174
K 25	21/12	269	200	69	252	174
	27/12	303	220	83	285	188
	10/1	341	226	115		97

kation concentration of about 26 mM of which only 0.5 mM was K and in a portion of the same water to which KCl was added so as to raise the total concentration to 46 mM with 20 mM K. After 5 weeks the sap from a few cells was analysed for K and total kations with the following results.

Table 7.

	Na + K	K	Diff.
Low K	187		
	195	150	41
High K	197		
	193	188	7

In this case the sums of Na and K were obtained not from conductivity determinations, but directly according to the method of LINDERSTRØM-LANG (1936). Lack of material prevented the repetition of this experiment which, if reliable, is interesting in showing a replacement of Na by K without any significant increase in total concentration.

It may be of interest that reactions similar to those now described were obtained by BOYLE and CONWAY (1940) in experiments on frog muscles. These, when exposed to increasing concentrations of potassium chloride from 12 mM up to 300 mM, while the external sodium remained constant at about 100, took up large amounts of potassium without swelling, but when the total

outside concentration was kept constant and sodium replaced with potassium, this ion was taken up with water causing a considerable swelling with constant potassium concentration inside the cells. It is shown by the authors that these results are predictable from the laws of physical chemistry and do not involve any active process. Observations made for us by dr. F. BUCHTHAL show that BOYLE and CONWAYS muscle cells had at all K concentrations above 12 mM irreversibly lost their vital properties. It is an interesting fact that in spite of this they would retain their very low permeabilities for a considerable period.

We have made a few observations showing that cells of *Tolyphlopsis* and *Nitella* are able likewise to retain for hours a very low permeability after the flow of protoplasm has been brought to a standstill by heat (40—50° C) or a brief exposure to formaldehyde.

### Attempts to determine the uptake of activity by analysis of the bathing fluid.

In our first experiments with active preparations both of  $^{24}\text{Na}$  and  $^{42}\text{K}$  we tried to measure the uptake of activity from a small measured volume of active fluid. A cell was inclosed in a somewhat longer paraffined glass tube, 50 or 60  $\mu\text{l}$  solution were put in and the tube sealed with paraffin at both ends. When the tube was slowly rotated about a horizontal axis at right angles to its length the drop would move back and forth between the two ends of the cell. At suitable intervals samples of 5  $\mu\text{l}$  were drawn, dried and counted, and finally the cell was taken out, washed once by dipping into inactive solution and a sample of sap obtained by centrifugation. Activity disappeared rapidly from the external fluid which was reduced several per cent in less than 1 minute and generally about 20 % in an hour or so. As an example we give an experiment made on Novbr. 17 on a cell weighing 32.5 mg and placed in a paraffined tube in 50  $\mu\text{l}$  20 mM K with an activity put at 100. Samples of 4.8  $\mu\text{l}$  were taken at intervals with the results given in table 8. After 2½ hours the cell was taken out, superficially dried with filter paper and transferred to a second tube containing the same solution, but without activity. The general results of such experiments were very irregular and the final analyses of the sap showed only a minimal activity. We thought at the time that the results must be interpreted as a rapid uptake into the protoplasm, but it turned out that practically the whole activity lost from the external fluid was combined in the cell surface and largely in the cellulose wall.

This was borne out in a special experiment in which some cells of *Tolyphelopsis* and *Nitella* were centrifuged so as to remove both sap and cytoplasm and leaving only the chloroplast layer and the cellulose walls. A cannula was tied into a few other cells and the content washed out completely with a current of salt solution.

The lengths of these skins were measured and they were exposed to a

Table 8.

1	2	3	4	5	6
Time	Bathing fluid		Total activity $2 \times 3$	Activity of sample	Activity disappeared
	Volume μl	Activity			
10 <sup>50</sup>	50	100	5000		
10 <sup>53</sup>	45.2	80	3620	384	995
11 <sup>01</sup>	40.4	78	3150	364	
11 <sup>16</sup>	35.6	80	2850	384	
13 <sup>20</sup>	30.8	66.5	2050	319	415
13 <sup>22</sup>	50	0			
13 <sup>25</sup>	45.2	14.5	655	70	— 655
13 <sup>50</sup>	40.4	16.5	665	79	— 80
Sap	25.7	2.1	54		+ 621

solution containing  $^{24}\text{Na}$  for 1 hour and for  $2\frac{1}{2}$  hours respectively. Thereupon they were taken out, washed in the usual way ( $3 \times 1$  minute), cut into pieces of suitable length, dried and exposed in the GEIGER counter. All of them showed activity, and in the case of *Tol.* with the layer of chloroplasts it amounted to 3—5 times the activity in a corresponding quantity of solution, while the activity of the cellulose membrane alone was not much in excess of (or definitely lower than) the solution which it might contain (but which one would expect to remove by the washing). In *Nitella* on the other hand most of the activity appeared to be located in the cellulose membrane. The experiments are, however, too few and the results too discordant to settle this point. They are only sufficient to show that activity determinations on the bathing fluid cannot give any reliable information regarding the uptake into the living cells, because large and variable amounts are »adsorbed» to the cell surface.

#### Preliminary experiments with analysis of the cell sap.

In a preliminary experiment on Oct. 26 5 cells of *Tolyphelopsis* were put into 25 mM labeled Na. The cells were taken out at intervals from 1.5 to about 10 hours and samples of the sap analysed for activity. In per cent of the bath-

ing fluid the activity amounted to 0.9 to 1.6, showing no increase with time and it was concluded that the activity found was mainly due to contamination with outside fluid as no washing was carried out.

In a second  $^{24}\text{Na}$  experiment, Novbr. 7—11, 5 cells were put into paraffined tubes, each charged with 60  $\mu\text{l}$  bathing fluid with 26 mM labeled Na, very nearly the same concentration in which they had been living for 6 weeks, and rotated as described for 83 hours. The concentration of Na in the sap is assumed to be uniform at 40 mM. Samples of 4.8  $\mu\text{l}$  were taken after 1, 36 and 83 hours and showed a somewhat irregular fall in activity. The sap was collected from each cell separately without washing and the activity determined.

The following activities were determined in % of the original bathing fluid.

Table 9.

1	2	3	4	5	6
Bathing fluid after		Sap after 83 hours		Sap corrected $\frac{\text{col.} 3+4}{2}-1.4$	$C_o \frac{a_s}{a_o}$
1 h.	83 h.	% of initial	% of final		
91	82	7	8.5	6.3	1.63
95	110 <sup>1)</sup>	9	8.2	7.2	1.87
78	86	7	7.2	6.2	1.61
84	73	5	7	4.6	1.19
99	82	11	12.5	10.3	2.67

In column 5 is given the average percentage concentration of the sap, corrected for the contamination found in the experiment of Oct. 26.

Calculated according to the formula we find:

Table 10.

1	2	3	4	5	6
Diameter of cell $\text{cm} \times 10^{-2}$	$0.576 \frac{d}{t} \times 10^{-4}$	$C_s - C_o \frac{a_s}{a_o}$	$\log (3)$	$\log C_s - \log (3)$	$\text{col. } 2 \times 5 K \times 10^5$
7.9	5.5	38.37	1.5840	0.0181	1.0
7.2	5.0	38.13	1.5812	0.0209	1.0
7.4	5.1	38.39	1.5842	0.0179	0.9
9.0	6.2	38.81	1.5889	0.0182	0.8
6.3	4.4	37.83	1.5721	0.0300	1.3
				Average	1.0

<sup>1)</sup> Sealing of tube incomplete. Some evaporation.

In determinations made on Novbr. 21—27 12 cells were placed in 25 ml 25 mM active sodium chloride, 3 cells were analysed separately after 106 hours and 8 more after 147—148 hours in groups of 2, 2 and 4. In this case the cells were carefully washed in the same solution without activity before taking the sample of sap.

The results after 106 hours were  $K$  values of 1.0, 5.5 and  $3.1 \times 10^{-5}$  and after 147—48 hours 2.2, 3.3 and  $3.6 \times 10^{-5}$  giving an average of 3.1. We are unable to explain the higher values observed in this case. No precautions were taken in these preliminary experiments to guard against evaporation, but the error hereby introduced can scarcely be significant.

On Novbr. 17 25 cells with an average K concentration in the sap of 188 mM, which had been kept since the beginning of Octbr. in diluted sea water containing 20 mM K, were placed in 50 ml of the same solution containing  $^{42}\text{K}$ , and in another vessel 25 cells taken from a solution with only 0.6 mM K and having an average K concentration in the sap of 150 mM were put into the same active solution. We expected to find a considerable difference in the uptake of activity, because the second group of cells had not reached a steady state with the bathing fluid. Cells were taken out at intervals, washed  $2 \times 3$  min. in inactive salt solution, dried rapidly with filter paper and the sap obtained by centrifugation without any protection against evaporation. The results are given in table 11.

Table 11.

Exp. with  $^{42}\text{K}$  on Tol. I  $C_s$  188,  $C_o$  20 mM K, II  $C_s$  150,  $C_o$  20 mM K.

Hours	I.									
	2.8		5.5		15.1		28		81	
$d \text{ cm} \times 10^2$	7.1	7.3	7.1	7.9	6.5	6.8	7.3	7.5	9.0	8.7
$C_s - C_o \frac{a_s}{a_o}$	176.4	178.3	165	178.3	147	161	161	180	82	52
$K \times 10^5$	(40)	(35)	42	19	28	18	10	2.9	23	34
II.										
Hours	2.6		5.3		15.0		28		80	
$d \text{ cm} \times 10^2$	7.1		7.3	7.5	6.8	6.6	6.8		7.9	7.1
$C_s - C_o \frac{a_s}{a_o}$	144.2		199	127	98	140	102		0	0
$K \times 10^5$	(27)		79	58	48	7.5	..	23		

The average for all the cells in group I is  $25 \times 10^{-5}$  cm, and for the cells in group II  $40 \times 10^{-5}$  cm. When the determinations after 2.8 hours are left out, as less reliable, the values will be 21 and 43 respectively.

### Final experiments with determinations on sap and protoplasm.

These experiments were carried out late in February and with all the precautions we could think of, but it is possible that the *Tolyphelopsis* cells, which had been kept in the laboratory for over 5 months, exposed to artificial light of low intensity, were not in perfect health. The turgor was good, however, and slow plasma rotation was observed, although with some difficulty, in a number of cells. The *Nitella* material was quite fresh and in excellent condition.

In tables 12 and 13 the results are given, and for the protoplasm we have included both the activity figures directly measured  $C_o \frac{a_p}{a_o}$  and those calculated for the unmixed protoplasm by means of the formula on  $p \cdot 6 C_o \frac{a_p}{a_o}$ .

Table 12.

Exp. with  $^{24}\text{K}$  on *Tol.*  $C_s = C_p$  150,  $C_o$  1.43 mM K and *Nitella*  $C_s = C_p$  90,  $C_o$  0.6 mM K.

Hours	<i>Tolyphelopsis</i>						<i>Nitella</i>				
	1	6.7	20.7	23	44.8	68.8	1	5.3	19.7	43.8	67.9
$d \text{ cm} \times 10^2$	6.7	7.2	7.2	6.7	8.0	7.1	5.9	5.2	5.8	7.0	5.6
$C_o \frac{a_p}{a_o}$	0.40	0.50	8.9	9.0	3.7	6.1	0.84	1.74	2.5	5.0	2.8
$C_o \frac{a_p}{a_o}$	0.90	1.15	10.7	9.1	4.3	6.1	0.72	4.4	5.0	9.5	2.9
$C_o \frac{a_s}{a_o}$	0.04	0.11	8.0	8.7	3.4	6.1	0.17	0.27	1.26	2.0	1.6
$K \times 10^5$	(0.2)	4.8	4.4	1.0	1.1		(0.8)	1.0	0.9	0.4	
$R_i \frac{\%}{R_o}$	(0.7)	1.8	0.8	0.6			(4.6)	4.2	8.5	1.4	

It is perhaps worthy of note that a fairly large concentration of labeled ions is reached in the protoplasm within the first hour, suggesting the results obtained by BROOKS (1939) and MULLINS (1940) for active potassium and by AGNES WERNSTEDT (1944) for active lead.

It requires several hours before a steady state is reached allowing a calculation of  $K$ . Even so the results are rather discordant. This is not to be wondered at, because the method is indirect, and we cannot be sure that the diffusion out from the cell is at every moment exactly balanced by the uptake. Even larger discrepancies are seen when the different experiments are compared in table 14.

Table 13.

Exp. with  $^{24}\text{Na}$  Tol.  $C_s = C_p$  50 mM,  $C_o$  44 mM and Nit.  $C_s = C_p$  113,  $C_o$  4.9 mM.

	<i>Tolyphelopsis</i>					<i>Nitella</i>		
Hours	1.6	47.5	95.7	120	120	1	47.3	95.3
$d \text{ cm} \times 10^2$	6.2	6.5	6.2	6.6	5.6	6.3	6.0	5.8
$C_o \frac{a_p}{a_o}$	0.57	1.8	2.6	4.8	9.2	0.04	1.7	0.73
$C_o \frac{a_p}{a_o}$	1.6	2.2	3.2	7.5	16	0.073	2.6	0.7
$C_o \frac{a_s}{a_o}$	0.26	1.06	2.8	3.9	7.5	0.01	0.47	0.32
$K \times 10^5$		0.7	0.7	1	1.8		0.13	0.04
$R_i$		2.2	1.8	7	17		1.9	0.3
$R_o$								

Table 14.

Summary of permeability determinations.

Potassium.						
	Date	Duration h.	Number of det.	$C_o$	$C_i$	$K \times 10^{-5}$
<i>Tolyphelopsis</i>	17/11	15—81	6	20	188	2.9—28
	—	15—28	3	20	150	7.5—48
<i>Nitella</i>	23/2	21—69	4	1.4	150	1.0—4.8
	—	20—68	3	0.6	90	0.4—1.0
Sodium.						
<i>Tolyphelopsis</i>	7/11	83	5	26	40	0.8—1.3
	21/11	106—147	6	25	40	1.1—5.5
<i>Nitella</i>	28/2	47—120	4	44	50	0.7—1.9
	—	47—95	2	4.9	113	0.04—0.13

It seems certain that *Nitella* is less permeable than *Tolyphelopsis*, as one would expect from the habitat in fresh water, often very poor in inorganic substances. It appears also as a fairly reliable result that potassium penetrates more easily than sodium, as one would expect from the relative dimensions of the two ions given by BOYLE and CONWAY as 1.49 for sodium, when potassium is taken as 1.00.

We ourselves place most reliance on the lowest figures for  $K$ , but it seems quite possible that the permeability can show wide variations. Our figures are of the same order of magnitude as the lowest found by COLLANDER and BÄRLUND (1933) for organic molecules like glucose, which are practically insoluble in lipoids. The technique available to COLLANDER and BÄRLUND did not allow any precise determination for these very slowly permeating substances, but only the statement that the constant is lower than  $3 \times 10^{-5}$ . Unfortunately we have no means of ascertaining the relative dimensions and rates of movement of the ions and molecules respectively. Although the constants found are extremely low they would be sufficient to allow a fairly rapid exchange of ions in animal cells of small dimensions, like red blood corpuscles and muscle fibres. A  $K$  of  $1 \times 10^{-5}$  cm corresponds in a *Tolypellopsis* cell of 0.7 mm diameter to a half saturation period of 1200 hours or 50 days, but in a muscle fibre of  $25 \mu$  diameter to 43 hours only, when we make the probable assumption that practically the whole of the resistance is located in the surface membrane of the fibre. For a red blood corpuscle of the usual dimensions ( $8 \mu$  diameter and  $2 \mu$  thickness) the volume works out as  $88 \mu^3$  and the surface as  $125 \mu^2$ . In such a corpuscle the permeability of  $1 \times 10^{-5}$  would correspond to a half saturation period of 4.9 h, and there is no doubt that the actual permeability is definitely lower.

### **The relative diffusion resistances of the two protoplasmic membranes.**

The inner protoplasmic membrane separates two fluids which are assumed to be identical with regard to the concentrations of dissolved ions, and which are at least very similar so far as Na and K are concerned, while the outer membrane separates the cell content from a bathing fluid of widely differing composition. It is therefore to be expected that the main resistance towards diffusion is located in the outer membrane, and this is what we have found; that of the inner making up from less than one to a few per cent of the total. There is no reason to assume the existence of any active transport mechanisms in the inner membrane, although we have no material to disprove it, but the uncertainty of the calculation of activities in the protoplasm proper seriously reduces the reliability of the single determinations. The main fact of its being many times more permeable to ions than the outer cannot be doubted however.

## Summary.

In the sap of the large cells of *Characeae* a number of ions are found in concentrations far exceeding those in the bathing fluid, and the total concentrations are much higher. Examples of such concentrations are given and the dependence of the inside on the outside concentrations studied in a few cases.

It is assumed that the maintenance of the large concentration differences for single ions are brought about as a »steady state», the amount diffusing out being regularly replaced by an active »adenoid» uptake of the ion in question.

On this assumption the rate of diffusion is measured through determination of the uptake of radioactively »labeled» isotopes of the same elements, and methods are described for such determinations, after isolation of samples of the sap and the protoplasm of the cells.

Formulas are derived for expressing by means of activity determinations the diffusion constant in cm/hour and the relative diffusion resistance of the inner and outer protoplasmic membranes.

Data are presented for the weight and dimensions of the different constituents of *Tolyphelopsis* cells.

The thickness of the protoplasmic layer has been determined microscopically on living cells and is on an average  $13.5\ \mu$  in *Tolyphelopsis* and 13 in *Nitella*. The differences in concentration of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  found between sap and protoplasm are slight and inconstant, and it is assumed that the concentrations are identical.

Determinations of the change in activity of small volumes of bathing fluid cannot be utilized to study the uptake into cells, because considerable amounts are »adsorbed» on the outside.

Two series of determinations of the rate of uptake of  $^{42}\text{K}$  in *Tolyphelopsis* have given rather variable results, but the most reliable point to a permeability constant of  $3 \times 10^{-5}$ . In several cells much higher figures are found, up to constants of  $5 \times 10^{-4}$ , while the corresponding figure for *Nitella* from a small number of determinations is  $0.8 \times 10^{-5}$ . Experiments with  $^{24}\text{Na}$  have given a constant about  $1 \times 10^{-5}$  for *Tolyphelopsis* and  $1 \times 10^{-6}$  for *Nitella*. The variations observed are much smaller than with potassium. The significance of these figures is briefly discussed.

Comparative determinations of the concentration of activity in protoplasm and sap, respectively, show that the permeation resistance resides mainly in the outer protoplasmic membrane, while the inner is responsible for a few per cent at most.

## REFERENCES.

BIILMANN, GERDA, 1938. Über den Blutjodspiegel. Diss. Kopenhagen.

BOYLE, P. and CONWAY, E. J., 1941. Potassium accumulation in muscle and associated changes. *J. Physiol.* **100**, 1—63.

BROOKS, S. C., 1938. The penetration of radioactive potassium chloride into living cells. *J. of cell. a. comp. physiol.* **11**, 247—252.

COLLANDER, RUNAR, Permeabilitätsstudien an *Chara ceratophylla*.  
I. 1930. Die normale Zusammensetzung des Zellsaftes. *This journ.* **6**, 1—18.  
—»— & H. BÄRLUND,  
II. 1933. Die Permeabilität für Nichtelektrolyte. *Ibid.* **11**, 1—114.  
III. 1939. Die Aufnahme und Abgabe von Kationen. *Protoplasma* **33**, 215—256.

HOLM-JENSEN, IB, 1943. A Method of Correcting for Counting Losses in GEIGER-MÜLLER Counters with Special Reference to the GEIGER-MÜLLER Counter Arrangement Described by HILDE LEVI (1941). *Acta physiol. Scand.* **5**, 271—276.

KROGH, AUGUST, 1943. The Exchange of Ions between Cells and Extracellular Fluid. I. The Uptake of Potassium into the Chorion Membrane from the Hens Egg. *Acta physiol. Scand.* **6**, 203—221.

—»— ANNA-LOUISE LINDBERG and BODIL SCHMIDT-NIELSEN, 1944. The Exchange of Ions between Cells and Extracellular Fluid. II. The Exchange of Potassium and Calcium between the Frog Heart Muscle and the Bathing Fluid. *Acta physiol. Scand.*

LEVI, HILDE, 1941. A GEIGER Counter Arrangement Applied to Measurements of Radioactive Indicators in Biological Research. *Acta physiol. Scand.* **2**, 311—323.

LEVY, MILTON, 1936. A Micro Kjeldahl Estimation. *C. rend. Lab. Carlsb. ser. Chim.* **21**, 101—110.

LINDERSTRØM-LANG, K., 1936. Microestimation of alkalies in tissue. *C. rend. Lab. Carlsb. ser. Chim.* **21**, 111—122.  
—»— 1942. Approximate solution of certain diffusion problems in liquid systems. *C. rend. Lab. Carlsb. ser. Chim.* **24**, 249—279.

MULLINS LORIN, I., 1940. Radioactive Ion Distribution in Protoplasmic Granules. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.* **45**, 856—858.

WARTIOVAARA, V., 1944. The permeability of *Tolyphlopsis* cells for heavy water and methyl alcohol. *This journ.* **34**, 1—22.

WERNSTEDT, AGNES, 1944. On the absorption of lead into the cells of *Nitella*. *This journ.* **35**, 1—8.





ACTA BOTANICA FENNICA 37  
EDIDIT  
SOCIETAS PRO FAUNA ET FLORA FENNICA

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PHLORO-  
GLUZINDERIVATE FINNISCHER FARNARTEN

VON

BERTEL WIDÉN

MIT 13 TAFELN

HELSINGFORSIAE 1944

HELSINGFORS 1944  
DRUCK VON A.-G. TILGMANN

## Inhalt.

	Seite
<b>Vorwort .....</b>	<b>4</b>
I. Geschichtliches .....	5
II. Arbeitsplan .....	9
III. Beschreibung der Rhizome der untersuchten Farnarten .....	10
IV. Isolierung der kristallinischen Phlorogluzinderivate aus <i>Dryopteris spinulosa</i> und <i>D. austriaca</i> .....	16
A. Isolierungsmethoden .....	16
B. Resultate .....	21
C. Zusammenfassung der Resultate .....	23
V. Mikrochemische Studien über die isolierten Phlorogluzinderivate .....	25
A. Arbeitsmethodik .....	26
B. Versuche mit den isolierten Phlorogluzinderivaten .....	27
1. Aspidin .....	27
2. Albaspidin .....	29
3. Flavaspidsäure .....	30
4. Filixsäure .....	31
5. Aspidinol .....	33
6. Phloraspin .....	35
C. Versuch zum Nachweis der in den entsprechenden Drogen natürlich vorkommenden Phlorogluzinderivate durch Mikrosublimation .....	36
1. <i>Dryopteris spinulosa</i> (Müll.) Ktze .....	37
2. <i>Dryopteris austriaca</i> (Jacq.) Woyn. .....	39
3. <i>Dryopteris filix mas</i> (L.) Schott .....	40
4. <i>Dryopteris cristata</i> (L.) A. Gray. ....	41
5. <i>Athyrium filix femina</i> (L.) Roth.....	42
VI. Physiologische Wirkung der natürlichen Farnbestandteile .....	42
A. Frühere Untersuchungen über die Wirkung der Filixdroge ..	42
B. Eigene Untersuchungen .....	52
1. Orientierende Versuche .....	52
2. Versuche bei bestimmtem pH-Wert .....	56
3. Vergleich mit früheren Resultaten .....	65
VII. Die Filixdroge in verschiedenen Pharmakopöen .....	67
VIII. Zusammenfassung .....	74
Literaturverzeichnis .....	76

## Vorwort.

Die vorliegende Untersuchung wurde im Frühjahr 1937 begonnen und im Herbst 1943 abgeschlossen. Die Arbeiten konnten jedoch nicht in einem Zug ausgeführt werden, sondern sie wurden zweimal durch die Kriege unterbrochen, welche bewirkten, dass ich zum Heeresdienst einberufen wurde. Diese unfreiwilligen Unterbrechungen waren natürlicherweise von grossem Nachteil für die experimentellen Arbeiten und hatten u. a. zur Folge, dass ich mein ursprüngliches Untersuchungsprogramm umändern musste.

Im Verlauf der Arbeit hat mir vor allem mein Lehrer und Freund Herr Professor HUGO KARMA mit nie versagendem Interesse beigestanden und meine Untersuchungen durch Rat und Anleitung gefördert, wofür ich ihm hiermit meinen aufrichtigsten Dank ausspreche. Wärmsten Dank schulde ich ferner Herrn Professor RUNAR COLLANDER für heilsame Kritik bei der Durchsicht des Manuskriptes und insbesondere für die unschätzbare Hilfe, die er mir bei der Planung und Behandlung der physiologischen Versuche geleistet hat. Für wertvolle Hilfe bei der Überprüfung verschiedener Abschnitte der Arbeit fühle ich mich weiter den Herren Professor KURT BUCH und Dr. phil. GUNNAR MARKLUND zu Dank verpflichtet.

Besonderen Dank möchte ich der Societas pro fauna et flora fennica dafür abstatte, dass die Gesellschaft diese Publikation in ihre Schriftenserie *Acta Botanica Fennica* aufgenommen, und grossen Dank schulde ich vor allem dem Vorsitzenden der Gesellschaft, Herrn Professor ALVAR PALMGREN, für das Interesse und die Hilfe, derer ich mich von seiner Seite bei der Redigierung der Abhandlung erfreuen durfte.

*Der Verfasser.*

## I. Geschichtliches.

*Rhizoma filicis* ist eine uralte Droge. Schon Gelehrte des Altertums, wie THEOPHRAST, DIOSCORIDES und PLINIUS d. Ä. (alle nach TSCHIRCH 1923 S. 18—19), kannten die wurmabtreibenden Eigenschaften des Farnrhizoms, und in den Schriften des DIOSCORIDES findet man eine eingehende Beschreibung der Drogenpflanze, in der wir unseren gemeinen Farn *Dryopteris filix mas* wiedererkennen können. Im Verlauf des Mittelalters scheint die Droge grossenteils in Vergessenheit geraten zu sein, und erst in neuerer Zeit findet man sie wieder in der Literatur als Bandwurzmittel genannt. Früher bediente man sich unmittelbar des pulverisierten Wurzelstocks, aber im Jahre 1825 (nach TSCHIRCH 1923 S. 19) führten die Brüder J. und CHR. PESCHIER in Genf das Ätherextrakt von *Dryopteris filix mas* als Anthelmintikum ein, und dieses verdrängte dann rasch die vordem übliche Arzneiform, so dass das Ätherextrakt heute in den Pharmakopöen der meisten Länder vorgeschrieben ist. Auch auf die Einzelbestandteile der Droge richtete sich die Aufmerksamkeit zum ersten Male im Anfang des vorigen Jahrhunderts. Schon Peschier und später TROMMSDORFF, OSANN, BATSO u. a. (alle nach TSCHIRCH 1923 S. 11) bemerkten, dass sich im Ätherextrakt bei längerem Stehen ein körniger, gelblicher Niederschlag bildete, doch erst LUCK (1845) reinigte und untersuchte diesen näher und gewann aus ihm durch Umkristallisieren aus Äther eine kristallinische Substanz, die er *Filixsäure* nannte. In den nächstfolgenden Jahren wurde der neuentdeckte Stoff von verschiedenen Forschern, wie DACCOMO, RULLE (beide nach TSCHIRCH 1923 S. 19) und GRABOWSKY (1867), untersucht. Letzterer konnte zeigen, dass die Substanz bei Einwirkung von Alkalien unter Bildung von Buttersäure und Phlorogluzin zerfiel, und damit war erstmals festgestellt, in welcher Gruppe von Stoffen die Filixsäure unterzubringen war. Die Auffassung über die anthelmintische Wirkung der Filixsäure wechselte stark. POULSSON (1892) glaubte dies durch die Annahme erklären zu können, dass die Filixsäure in zwei auch chemisch voneinander unterschiedenen Formen auftrete, nämlich in einer wirksamen, gewinnbar als amorphes Pulver mit dem Schmelzpunkt 125° bei Ausfällung aus alkalischer Lösung mittels Säure, und einer unwirksamen, die durch Umkristallisieren des amorphen Pulvers aus Äther als kristallinischer Stoff mit dem Schmelzpunkt 184° zu erzielen war. Jene Form be-

zeichnete er als *Filixsäure*, diese als *Filizin* oder *Filixsäureanhydrid*. Diese Auffassung findet man indessen in der späteren Literatur nicht bestätigt, sie wird vielmehr von KRAFT (1903) widerlegt, der beide Formen unwirksam gefunden hat.

Es dauerte bis zum Ende des vorigen Jahrhunderts, ehe die Konstitution der Filixsäure eine eingehendere Klärung fand, und gleichzeitig stellte es sich heraus, dass die Filixsäure im Extrakt von einer ganzen Gruppe hinsichtlich der Wirkung und des chemischen Aufbaus nahe verwandter Stoffe begleitet ist. Diese antihelminisch wirkenden Stoffe, die kurz als Phlorogluzinderivate bezeichnet werden, wurden gleichzeitig auch in den Wurzelstöcken anderer Farne nachgewiesen, und um die Jahrhundertwende waren mehrere Forscher damit beschäftigt, die im Ätherextrakt des Farmrhizoms enthaltenen kristallinischen »Felixsubstanzen» zu isolieren und näher zu studieren.

L'AURÉN wies im Jahre 1897 nach, dass das Ätherextrakt von *Aspidium spinulosum*<sup>1</sup> eine starke antihelminische Wirkung besass. POULSSON (1895, 1898) unterwarf ungefähr gleichzeitig den Ätherauszug der gleichen Farnart einer eingehenderen Untersuchung, und es gelang ihm, aus demselben fünf neue »Felixstoffe» zu isolieren, die er Polystichin, Polystichalbin, Polystichinin, Polystichozitrin und Polystichoflavin nannte. Alle diese Stoffe liessen sowohl in bezug auf ihre Wirkung als auf ihre chemische Konstitution eine weitgehende Verwandtschaft mit der Filixsäure erkennen.

Es sind in erster Linie die vorzüglichen Untersuchungen BOEHMS über die in die Filixsäuregruppe fallenden Bestandteile des *Filix mas*-Extraktes, denen wir unsere gegenwärtige Kenntnis dieser Stoffe verdanken. In seiner grundlegenden Arbeit vom Jahre 1897 entwickelte er ein neues, schonendes Verfahren zur Isolierung der Phlorogluzinderivate aus dem Extrakt, das später von den meisten Forschern — auch von Poulsson in der späteren seiner beiden oben angeführten Arbeiten — befolgt worden ist. Mittels dieses Verfahrens gelang es Boehm, aus dem Ätherextrakt ausser der Filixsäure folgende Stoffe zu gewinnen, die sich zum Teil als mit den Poulssonschen identisch erwiesen: *Aspidin* (=Polystichin), *Albaspidin* (= Polystichalbin), *Flavaspidäsäure* (= Polystichozitrin?), *Aspidinin* (= Polystichinin?), *Aspidinol* und später (1903 d) *Phloraspin*. In der Literatur hat man sich allgemein der Boehmschen Nomenklatur angeschlossen. In einigen späteren Untersuchungen (1898, 1899, 1901 a—c, 1903 a—d) nahm Boehm eine Reihe von Konstitutionsbestimmungen an den neuentdeckten Stoffen vor, die zu einer ziemlich eingehenden Kenntnis ihres Aufbaus führten, so dass es uns seitdem möglich ist, für die meisten von ihnen auch die Strukturformeln anzu-

---

<sup>1</sup> In diesem Abschnitt wird jeweils die in den betreffenden Originalarbeiten gebrauchte Nomenklatur befolgt.

geben. Bei seinen verdienstvoll durchgeführten Arbeiten ging Boehm vom Handelsprodukt aus, ohne irgendwelche Gewähr dafür zu haben, dass das Extrakt wirklich von der offizinellen *Aspidium filix mas*-Droge stammte. Wie sich später herausstellte und auch ihm selbst nicht entging, muss das Material jedoch zum grossen Teil nicht von der genannten Art, sondern von *A. spinulosum* hergerührt haben, da er bei seinen Analysen grosse Mengen von Aspidin gewann, das, wie sich gezeigt hat, in der offizinellen Droge völlig fehlt. Boehms Schüler HAUSMANN (1899) konnte dann nachweisen, dass das Aspidin, wie auch zum Teil aus den Arbeiten Poussons hervorgegangen war, einzig *Aspidium spinulosum* zukommt, während die Filixsäure für *Aspidium filix mas* spezifisch ist. Im übrigen enthalten die Wurzelstücke der beiden erwähnten Farnarten die gleichen Phlorogluzinderivate. Hausmann glaubte ferner zeigen zu können, dass *Athyrium filix femina*, ein Farn, der früher ebenfalls als Wurmmittel gedient hatte, Filixsäure und Flavaspidsäure in ungefähr ähnlichen Mengenanteilen wie *Aspidium filix mas* enthielt.

Von den Forschern, die sich um die Jahrhundertwende mit einschlägigen Untersuchungen beschäftigten, ist noch KRAFT zu erwähnen, der bei seinen Arbeiten von dem Gedanken geleitet wurde, in dem offizinellen *Filix mas*-Extrakt den wirklich anthelmintisch wirkenden Bestandteil ausfindig zu machen, der seiner Meinung nach noch nicht bekannt war. Ausser den oben bereits erwähnten Stoffen gelang es nun Kraft (1904), aus dem Ätherextrakt grosse Mengen einer amorphen Substanz zu isolieren, die er *Filmaron* nannte und die nach ihm allein das wirksame Prinzip in dem Extrakt repräsentierte. Er konnte zeigen, dass sich diese Substanz in bezug auf ihre chemischen Eigenschaften eng an die von früher her bekannten Filixstoffe anschloss. Da er bei der Spaltung des Filmarons Filixsäure und Aspidinol erhielt, nahm er an, dass es eben aus diesen zwei Komponenten aufgebaut sei und gab im Anschluss daran sogar die Strukturformel des Filmarons, die sich durch vier Phlorogluzinkerne auszeichnen sollte, an. Gemäss den chromatographischen Untersuchungen von FICHTER (1938) dürfte jedoch das Filmaron aus einer Mischung mehrerer Stoffe bestehen.

Die Frage nach der pharmakologischen Wirkung des Filixextraktes war zu derselben Zeit ebenfalls Gegenstand lebhaften Interesses. Man glaubte dabei zu finden, dass im Herbst eingesammelte *Filix mas*-Rhizome ein wirksameres Extrakt als Sommerrhizome lieferten und dass Gebirgsdroge effektiver als im Tiefland eingesammelte Droge sei. Diese Auffassung, die sich lange Zeit behauptete und oft auch in der Literatur angeführt wurde, ja zum Teil sogar in manche Pharmakopöen Eingang gefunden hat, hat sich durch die Untersuchungen der letzten Jahre, vor allem in bezug auf den vermeintlichen Vorzug der Herbstrhizome, als unzutreffend erwiesen, und in zahlreichen Arbeiten (KOFLER & MÜLLER 1930; STAMM 1932; CARLSSON & BÄCKSTRÖM

1942; MAIZITE 1942) werden umgekehrt die Sommerrhizome als wertvoller erklärt. Die um die Jahrhundertwende entdeckten kristallinischen Filixstoffe wurden ebenfalls Gegenstand mannigfacher physiologischer Versuche zur Klärung ihrer pharmakologischen Wirkung. Namentlich die diesbezüglichen Untersuchungen des Physiologen STRAUB (1902) sollten für die Auffassung über die tenizide Wirkung der Filizstoffe massgebend werden.

Zusammenfassend ergibt sich uns aus den vor und nach der Jahrhundertwende ausgeführten Untersuchungen über die Filixstoffe des Farnrhizoms folgendes Bild. Die wurmabtreibenden Eigenschaften der Wurzelstücke sind wenigstens der Hauptsache nach durch die in der Droge enthaltenen Phlorogluzinderivate — Kondensationsprodukte von Buttersäure und verschiedenen Methylphlorogluzinen — bedingt. Diese Spaltungsprodukte lassen sich aus den natürlichen Filixstoffen durch Reduktion mit Zink in alkalischer Lösung gewinnen. Die in den Wurzelstücken auftretenden Phlorogluzinderivate sind in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, aber nicht in Wasser löslich. Als schwache Säuren bilden sie hingegen mit Alkalien wasserlösliche Salze.

Das aus der offizinellen *Aspidium filix mas*-Droge bereitete Extrakt enthält folgende Phlorogluzinderivate (die angeführten Prozentwerte gelten nach KRAFT (1904) für gute Droge: Filixsäure 3,5 %, Flavaspidsäure 2,5 %, Albaspidin 0,05 %, Aspidinol 0,1 %, Phloraspin 0,1 % und Filmaron 5 %).

Das Extrakt von *Aspidium spinulosum* enthält Flavaspidsäure, Albaspidin, Aspidinol und Phloraspin in annähernd gleichen Mengenanteilen wie das *Filix mas*-Extrakt. Filmaron und Filixsäure fehlen, sind aber durch das zu etwa 1—2 % auftretende Aspidin ersetzt.

Die wurmabtreibenden Phlorogluzinderivate haben nach der geltenden Auffassung ihren Sitz in den von METTENIUS (nach TSCHIRCH 1923 S. 9) entdeckten sog. inneren Sekrethaaren, denen man in den Interzellularen des Grundgewebes des Farnrhizoms und der Blattstielbasen begegnet.

Auf diesem Punkt blieben dann die Untersuchungen über die kristallinischen Filixstoffe längere Zeit stehen. Spätere Arbeiten sind vor allem auf eine Wertbestimmung der Droge bzw. des aus ihr bereiteten Extraktes aus gegangen.

Schon um die Jahrhundertwende entwickelte FROMME (nach TSCHIRCH 1923 S. 13) ein Verfahren zu Wertbestimmung der Filixdroge. Es ist dies die allbekannte Bestimmung des Rohfilizingehaltes, die auch heute noch, obwohl in modifizierter Form, in den Pharmakopöen der meisten Länder zu finden ist. Die Methode hat seit Fromme mehrere Abänderungen erfahren, und es ist ihr in letzter Zeit auch berechtigte Kritik zuteil geworden. Derartige Rohfilizinbestimmungen der *Rhizoma Filicis*-Droge und des daraus bereiteten Extraktes sind an sowohl in bezug auf die Stammpflanze wie hin-

sichtlich des Zeitpunktes der Einsammlung verschiedenartigem Material besonders von STAMM (1932) und seinen Schülern (KILLINEN 1932) in Dorpat ausgeführt worden. Die neuerdings immer stärker hervortretende Kritik an der Rohfilizinbestimmung als Wertbestimmungsmethode hat sich wohl in die deutlichste Form bei WASICKY (1924) gekleidet, der in einer vergleichenden Untersuchung über den Rohfilizingehalt und die physiologische Wirkung in schlagender Weise die Schwäche des fraglichen Verfahrens dargetan hat. Anstatt dessen empfiehlt er eine von ihm ausgearbeitete biologische Wertbestimmungsmethode, die sich prinzipiell auf YAGIS (1914) Versuche über die Giftwirkung gewisser isolierter Filixstoffe auf Regenwürmer gründet.

Die Frage nach der Haltbarkeit der Filixdroge und des betreffenden Extraktes erhielt im Jahre 1938 einen wertvollen Beitrag durch eine Untersuchung von JARETZKY & PUNZEL, in der gezeigt wird, dass die Filixdroge am liebsten nicht als solche aufbewahrt, sondern unmittelbar zu Extrakt weiterverarbeitet werden sollte. Doch auch das Extrakt ist bei längerer Lagerung bedeutenden Veränderungen unterworfen und ist nur in Ampullen oder im Exsikkator haltbar.

In den allerletzten Jahren ist der Filixdroge ein lebhaftes Interesse entgegengebracht geworden. STAMM (1934) hat in Estland seine Untersuchungen über die estnischen Filixdrogen fortgesetzt, und in Schweden haben CARLSSON & BÄCKSTRÖM (1942) den verschiedenen Wertbestimmungsmethoden ein kritisches Studium gewidmet. Die eingehendsten Untersuchungen über hierhergehörige Fragen verdanken wir jedoch dem Letten MAIZITE (1938, 1942, 1943), dessen Arbeiten weiter unten noch genauer zur Sprache kommen werden.

Die Erforschung der einzelnen Phlorogluzinderivate und ihres Vorkommens in den Farnrhizomen ist jedoch noch in vielen Beziehungen unvollständig.

## II. Arbeitsplan.

Die für die vorliegende Untersuchung in Frage kommende Problemstellung lässt sich kurz in folgenden drei Punkten zusammenfassen.

1. In der vorangehenden geschichtlichen Übersicht wird *Aspidium spinulosum* als eine einheitliche Pflanzenart aufgeführt. Nach der Auffassung der Botaniker handelt es sich aber in Wirklichkeit um eine Kollektivart mit zwei wohlunterschiedenen Komponenten, nämlich *Aspidium spinulosum* oder *Dryopteris spinulosa* und *Aspidium dilatatum* oder *Dryopteris austriaca*. Die Einzelkenntnis der in diesen beiden Arten enthaltenen kristallinischen Filixstoffe ist noch sehr mangelhaft.

2. Bis auf weiteres fehlen so gut wie alle qualitativen Identitätsproben in bezug auf die wirkenden Substanzen, d. h. die Phlorogluzinderivate, mittels welcher sich diese in der Droge nachweisen lassen.

3. Die pharmakologische Wirkung der verschiedenen Filixstoffe ist bei weitem noch nicht erschöpfend geklärt.

Eine Erweiterung unserer Kenntnis in diesen drei Punkten hat sich die vorliegende Untersuchung zum Ziel gesteckt.

Zum Schluss wird die gegenwärtige Stellung der Filixdroge in verschiedenen Pharmakopöen erörtert.

In betreff des ersten Punktes, der getrennten Analyse der in den Arten *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* enthaltenen Phlorogluzinderivate, ist zu erwähnen, dass eine vorläufige Mitteilung bereits im Jahre 1939 von mir (WIDÉN 1939) veröffentlicht wurde. Außerdem ist im Laufe der Arbeit eine Veröffentlichung von MAIZITE (1942) erschienen, aus der hervorgeht, dass dieser Autor sich schon seit einer langen Reihe von Jahren mit dem gleichen Thema beschäftigt hat. Auf diese Untersuchung wird in späterem Zusammenhang noch zurückzukommen sein. Vorher möchte ich aber eine nähere Beschreibung der Wurzelstücke der in der vorliegenden Arbeit in dieser oder jener Hinsicht untersuchten Farnarten einschalten, *weil ich bei meinen Untersuchungen stets vom Rhizom selbst und nicht, wie es bisher meistens geschehen ist, von dem daraus bereiteten Ätherextrakt ausgegangen bin*. Die von mir untersuchten Farne repräsentieren den gesamten Pteridophytenbestand der finnischen Flora, in dem nach den vorliegenden Literaturquellen Phlorogluzinderivate vorhanden sind.

### III. Beschreibung der Rhizome der untersuchten Farnarten.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Farnarten sind, der modernen Nomenklatur gemäss benannt (früher wurden sie ja oft insgemein in der Gattung *Aspidium* untergebracht), die folgenden:

- Dryopteris filix mas* (L.) Schott
- Dryopteris spinulosa* (Müll.) Ktze
- Dryopteris austriaca* (Jacq.) Woyn.
- Dryopteris cristata* (L.) A. Gray.
- Athyrium filix femina* (L.) Roth.

Die in den Pharmakopöen der meisten Länder wie auch in der sechsten Auflage der finnischen Pharmakopöe als offizinell angeführte Art *Dryopteris filix mas* ist mit Ausnahme des atlantischen Nordamerika ein in sämt-

lichen Gebieten der gemässigten Zone weitverbreiteter Farn, den man eigentlich nur in der arktischen Zone, in Australien sowie grösstenteils in Afrika vermisst. Die Art ist in ganz Europa zu finden und ist in der Südhälfte Finnlands ein häufiger Bewohner steiniger und bewaldeter Hänge, geht aber als seltener Farn auch nordwärts bis nach Petsamo hinauf.

Die Droge wird von dem selten waagerecht kriechenden, gewöhnlich schräg aufsteigenden, fingerdicken, allseitig von den zentimeterdicken, dichtstehenden und aufgeschwollenen, in 3—4 cm Entfernung vom Rhizom abgeschnittenen Blattstielbasen umgebenen Wurzelstock gebildet, so dass die Droge im ganzen das Aussehen von 10—20 cm langen, fast armdicken Stücken erhält. Die Blattstielbasen und besonders die Rhizomspitze mit den in der Knospe schneckenartig eingerollten Blattanlagen sind dicht mit hellen, rostfarbigen Spreuschuppen oder Paleae besetzt. (Abb. 1.)

Die beiden nahe verwandten Arten *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* wurden früher als eine einheitliche Art aufgefasst, lassen aber so grosse gegenseitige Unterschiede erkennen, dass sie heute als selbständige Arten beschrieben werden. Beide gelten in der estnischen Pharmakopöe als offizinell und sind dort unter den Namen *Dryopteris spinulosa* subsp. *euspinulosa* und *D. spinulosa* subsp. *dilatata* aufgenommen.

Auch in Finnland haben die beiden Arten neben der offizinellen *Filix mas*-Droge weite Anwendung gefunden und bilden die häufigste Beimischung derselben. Beide sind bei uns ziemlich gemein, doch lässt sich in ihrer Verbreitung ein gewisser Unterschied erkennen. Die erstere Art, *D. spinulosa*, ist in Südfinnland häufig, wird aber nach ihrer ungefähr in Südlappland verlaufenden Nordgrenze hin allmählich immer seltener, *D. austriaca* dagegen ist noch in Petsamo zu finden und tritt an geeigneten Standorten in ganz Lappland auf. Auch die Standortswahl überhaupt ist bei beiden Arten deutlich verschieden. *D. austriaca* ist in dieser Hinsicht trotz ihrer weiteren Verbreitung anspruchsvoller und demzufolge auch als seltener anzusprechen, da man der Art nur auf besonders fruchtbarem Waldboden begegnet, während *D. spinulosa* als weit bescheidenere Art auch mit einer recht sterilen Unterlage vorlieb nimmt. *D. austriaca* gedeiht gewöhnlich in dichten Beständen und tritt an zusagenden Standorten oft massenweise auf, *D. spinulosa* wiederum begegnet man meistenteils in spärlicheren Beständen. *D. austriaca* ist der anderen Art sowohl in bezug auf die unter- als die oberirdischen Teile an Grösse bedeutend überlegen, und ihr Wurzelstock kann sich an Dicke mit dem *Filix mas*-Rhizom messen, während er bei *D. spinulosa* bedeutend schwächer ausgebildet ist. Ausser durch die verschiedene Größenentwicklung unterscheiden sich die *Austriaca*-Rhizome auch dadurch leicht von den *Spinulosa*-Rhizomen, dass die Blattstielbasen dicht mit lang zugespitzten, dunklen Spreuschuppen bekleidet sind, die dagegen bei *D. spinulosa* hell und abgestumpft

sind und vor allem sehr licht verteilt auftreten, ausser an der Rhizomspitze, wo sie eine Hülle um die eingerollten Blattanlagen bilden. Diese Merkmale sind leicht schon mit blossem Auge feststellbar. Äusserlich ähnelt das *Austriaca*-Rhizom sehr dem *Filix mas*-Rhizom und dürfte daher die gewöhnlichste Beimischung beim Einsammeln der offizinellen Droge darstellen. (Abb. 2 und 3.)

Diese Beschreibung der *Spinulosa*- und *Austriaca*-Rhizome gilt für die beiden typischen Arten. ROSENDALI (1911) gibt jedoch aus Schweden an, dass Zwischenformen häufig vorkommen, und er beschreibt dieselben denn auch als ein Hybridisationsprodukt, *D. spinulosa* × *austriaca*, der beiden Hauptarten. Diese Form ist nach ihm in Schweden ziemlich häufig und tritt namentlich in *D. austriaca*-Beständen unter Entwicklung einer beträchtlichen Variationsbreite sowohl in bezug auf den ober- wie den unterirdischen Spross auf, indem sich die Pflanzen habituell bald mehr *D. austriaca*, bald mehr *D. spinulosa* nähern. Auch die Spreuschuppen nehmen oft eine typische Zwischenstellung ein, indem sie dichter als bei *D. spinulosa*, aber lichter als bei *D. austriaca* gestellt sind und deren Mittelrippe, wenn vorhanden, stets heller als bei der typischen *D. austriaca* ist. Auch ich glaube in der Natur solche hybriden Zwischenformen beobachtet zu haben, und AMANUENSIS I. HRITONEN am Botanischen Institut der Universität Helsingfors hat mir auf meine Anfrage mitgeteilt, dass die Hybride auch aus Finnland vorliegt und dass er selbst solchen Formen begegnet ist.

*Dryopteris cristata* ist in ganz Südfinnland verbreitet, nirgends aber häufig zu finden, sondern ist nur durch Einzelvorkommnisse auf Moor- und nassem Wiesengelände vertreten. Am nördlichsten ist die Art in Finnland in Suomussalmi gefunden worden. Der Wurzelstock ähnelt äusserlich dem von *D. spinulosa*, ist aber gewöhnlich kleiner. Die Blattstielbasen sitzen nicht so dicht wie bei *D. spinulosa* und sind wie bei dieser mit licht gestellten, hellen Spreuschuppen bedeckt. (Abb. 4.)

*Athyrium filix femina* ist im ganzen Lande ein gemeiner Bewohner des feuchten Waldbodens, wo die dichten, üppigen Bestände des Farns oft ton-angebend auftreten. Der Wurzelstock weicht äusserlich schon recht bedeutend von dem der vorhergehenden Arten ab. Er ist mehr oder weniger verzweigt und entsendet von den senkrecht aufsteigenden Ästen die sehr dicht-gestellten, äusserlich schwarzen Blattstiele und zwischen diesen zahlreiche, gleichfalls schwarzgefärbte Nebenwurzeln. Die Blattstielbasen sind bedeutend schwächer entwickelt als bei den vorhergehenden Arten, abgeplattet und gegen ihren Ausgangspunkt vom Rhizom stark verschmälert und da-selbst auch mit Randdornen versehen. Alle diese Merkmale verleihen den

Rhizomen ein von den vorhergehenden Arten deutlich abweichendes Aussehen. Die Blattstielbasen sind gewöhnlich mehr oder weniger licht mit rostbraunen, länglich-schmalen Spreuschuppen besetzt. (Abb. 5.)

Die Rhizome der oben angeführten Farmarten sind im allgemeinen schon mit blossem Auge leicht zu erkennen. Die Art, deren Wurzelstock ohne Zweifel die grösste Ähnlichkeit mit der offizinellen *Filix mas*-Droge hat, ist, wie erwähnt, *Dryopteris austriaca*, deren Rhizom nahezu die Größenmasse der Pharmakopöedroge erreicht und das ungetubte Auge leicht zu Verwechslungen verleiten kann. Dem Kenner bereitet jedoch die Auseinanderhaltung der Wurzelstücke der beiden Arten keinerlei Schwierigkeiten. Die helle Paleae-Bekleidung der *Filix mas*-Droge verleiht ihr im ganzen einen helleren Farbton, durch den sich die Droge in den meisten Fällen von dem *Austriaca*-Rhizom mit dessen dunkler, glänzender, kastanienfarbener Paleae-Bekleidung unterscheidet, bei dem die dunkle Mittelrippe der einzelnen Schuppen auch dem unbewaffneten Auge deutlich entgegentritt. Schon bei der Einsammlung der Wurzelstücke bemerkt man einen deutlichen Unterschied. Die Rhizome von *Dryopteris filix mas* sitzen fest verankert in der Erde — in dieser Hinsicht erinnert die Art an das ebenfalls sehr fest in der Unterlage wurzelnde *Athyrium filix femina* — und lassen sich nur schwer loslösen, während die von *D. austriaca* recht lose sitzen und mit einem kräftigen Ruck aus dem Boden gerissen werden können.

In zweifelhaften Fällen leitet eine mikroskopische Nachprüfung der Spreuschuppen leicht zur einwandfreien Unterscheidung der beiden Farmdrogen. Zum erstenmal wurden die Schuppen von LAURÉN (1896) beschrieben, und seitdem sind sie von zahlreichen anderen Forschern in ihren Arbeiten abgebildet worden. In gewissen Einzelheiten gehen die Beschreibungen einigermassen auseinander, aber im grossen und ganzen hat es sich gezeigt, dass die Spreuschuppen gute Merkmale zur Identifizierung der Rhizome liefern. Nachstehend folgt in Anlehnung an frühere Angaben und auf Grund eigener Erfahrungen eine kurze, von Originalzeichnungen (Abb. 6) begleitete Beschreibung der Spreuschuppen der in der vorliegenden Untersuchung behandelten Farmarten. Zu bemerken ist bei derartigen Untersuchungen, dass man dazu nicht diejenigen Schuppen wählen darf, die die eingerollten Blattanlagen der Rhizomspitze umhüllen, weil sie bei den einzelnen Arten nicht so typisch wie die an den Blattstielbasen sitzenden Schuppen ausgebildet sind. Ferner sei darauf hingewiesen, dass die Grösse und Form der einzelnen Spreuschuppen trotz ihrer weitgehenden Variation beim gegenseitigen Vergleich der verschiedenen Farmrhizome dennoch ihren gegebenen Platz einnehmen.

*Dryopteris filix mas*. — Spreuschuppen hell, länglich zugespitzt, aus länglichen Zellen bestehend und an den Rändern mit zahlreichen, oft klauen-

förmig zurückgebogenen Zähnen versehen. Sekret- oder Drüsenhaare fehlen oder es sind vereinzelte solche nur am Grunde der Schuppe zu finden. STAMM (1931) fand im Gegensatz hierzu bei der Untersuchung estnischer *Filix mas*-Rhizome auch den übrigen Rand der Schuppen mit Sekrethaaren versehen.

*Dryopteris spinulosa*. — Spreuschuppen bleich, durchweg aus dünnwandigen Zellen aufgebaut, gewöhnlich breiter als bei der vorhergehenden Art, mit unbezahntem, aber mit kurzgestielten Drüsenhaaren versehenem Rand.

*Dryopteris austriaca*. — Spreuschuppen lanzettlich, lang und schmal zugespitzt, braun, aus langgestreckten Zellen aufgebaut und mit einer aus dickwandigen Zellen gebildeten, dunkler gefärbten Mittelrippe. Die Angaben über die Drüsenhaare dieser Art sind einigermassen divergierend. LAURÉN (1896) teilt mit, dass der Schuppenrand wie bei *D. spinulosa* mit reichlichen, kurzgestielten Drüsenhaaren besetzt ist. ÅNGMAN (1900) bildet den Rand mit langen, gleichbreiten, bandförmigen Haaren, aber ohne jegliche Drüsenhaare ab. Das Lehrbuch von WESTLING (1927) gibt eine Abbildung, in der der Schuppenrand wie bei Ångman mit langen, bandförmigen Haaren versehen ist, aber an der Spitze eines jeden von diesen sich eine Sekretdrüse befindet. ROSENDALH (1911) beschreibt die Spreuschuppen von *D. austriaca* mit teils kurzgestielten, teils von mehrzelligen Stielen getragenen Drüsenköpfchen. Bei meinen mikroskopischen Untersuchungen der Spreuschuppen dieser Farnart fand ich, dass oft sowohl die langen als die Drüsenhaare fehlten. Nur verhältnismässig selten waren an kleineren Schuppen jene vorerwähnten langen, gleichbreiten Haare und dazu spärliche kurzgestielte Sekretdrüsen festzustellen. Es liegt nahe anzunehmen, dass diese varierenden Beschreibungen wenigstens in gewissem Umfang darauf zurückzuführen sind, dass den Autoren die vorhin besprochenen hybriden Zwischenformen zwischen *D. spinulosa* und *D. austriaca* zur Untersuchung vorgelegen haben.

*Dryopteris cristata*. — Spreuschuppen ziemlich breit, in Farbe und Form denjenigen von *D. spinulosa* ähnlich, der Rand ebenso wie bei dieser Art mit Drüsenhaaren versehen, die Schuppenbasis aber aus dickwandigen Zellen aufgebaut. Dieses letztere Merkmal habe ich in keiner früheren Beschreibung der *D. cristata*-Schuppen vorgefunden. Sekrethaare sollen nach den Literaturangaben viel spärlicher als bei *D. spinulosa* vorkommen; in meinem Material waren sie aber reichlich vorhanden.

*Athyrium filix femina*. — Spreuschuppen ihrer Form nach denjenigen von *Dryopteris austriaca* ähnlich, braun, aber ohne die für die ebenerwähnte Art charakteristische Mittellinie, selten mit kleinen Zähnen versehen, ohne Sekrethaare.

Wie eingangs bereits bemerkt wurde, ist man der Ansicht, dass die Phlorogluzinderivate ihren Sitz in den sog. inneren Sekret- oder Drüsenhaaren haben

Diesen drüsenaartigen Haarbildungen begegnet man im Parenchym des Rhizoms und der aufgeschwollenen Blattstielbasen, wo sie, einzeln oder zu Gruppen vereinigt, in die Interzellularräume des Grundgewebes hineinragen und besonders zahlreich in der Gegend der Gefäßbündel auftreten. Nicht alle Interzellularräume enthalten jedoch Drüsenhaare. Die Drüsenhaare sind einzellig und tragen an der Spitze eines kurzen, schmalen Stiels das runde oder birnförmige sekretführende Köpfchen. (Abb. 7—8.)

Das gelbgrüne Sekret wird zwischen der Kutikula und dem übrigen Teil der Zellwand abgeschieden. HÖHLKE (1902), der das Sekret eingehender untersucht hat, hat zeigen können, dass es in bezug auf seine Löslichkeit an Harz erinnert. So löst es sich in Äthyl-, Methyl- und Amylalkohol, Äther, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff und Alkalien sowie in Eisessig. Diese Löslichkeitsverhältnisse erinnern an diejenigen der später zu beschreibenden Phlorogluzinderivate, und TSCHIRCH & OESTERLIE (1900) glaubten sogar auskristallisierte Filixsäure in den Drüsenhaaren von *Dryopteris filix mas* festgestellt zu haben; dieser Angabe ist indessen mit einer gewissen Reservation entgegenzutreten, da gerade die Filixsäure sich beim Auskristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln nur mit Schwierigkeit zur Bildung von wohlgebildeten Kristallen bewegen lässt. Dagegen sind die übrigen bekannten Phlorogluzinderivate mit Leichtigkeit in formreinen Kristallen zu gewinnen, weshalb man eher annehmen möchte, dass sich gerade irgendwelche von ihnen in den Sekrethaaren auskristallisieren könnten.

HÖHLKE (1902) konnte sekretführende Drüsenhaare ausser bei *Dryopteris filix mas* auch bei *D. spinulosa* und *D. austriaca* sowie bei *D. cristata* nachweisen. Das Harz der beiden mittleren Arten unterscheidet sich von demjenigen von *D. filix mas* dadurch, dass es sich nicht restlos im Alkohol löst. Sekrethaare fehlen nach Höhlke bei *Dryopteris thelypteris*, *Onoclea struthiopteris* und *Pteris aquilina*.

Bei *Athyrium filix femina*, das nach HAUSMANN (1899) desgleichen Phlorogluzinderivate enthält, fehlen die Drüsenhaare ebenfalls. Ein Schnitt durch den Wurzelstock oder die Blattstielbasis zeigt einen ganz anderen anatomischen Bau als bei den Rhizomen der sekretführenden Farnarten, indem die Zellen des Parenchyms sich fest aneinanderschliessen, so dass es gar nicht zur Bildung von Interzellularräumen kommt.

#### IV. Isolierung der kristallinischen Phlorogluzinderivate aus *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca*.

STAMM und seine Schüler haben während der letzten Jahre mannigfache Untersuchungen über die Rhizome der beiden in der Überschrift genannten Farnarten, u. a. auch vergleichende Bestimmungen des Extrakt- und Rohaspidin gehaltes in denselben ausgeführt (Stamm 1932), aber ein Vergleich der in diesen Wurzelstöcken enthaltenen kristallinischen Bestandteile ist wenigstens bis auf weiteres nicht in Stamms Arbeitsprogramm aufgenommen gewesen. Die um die Jahrhundertwende ausgeführten Untersuchungen von BOEHM, POULSSON und HAUSMANN betrafen, wie eingangs erwähnt, die Zusammensetzung des Rohaspidins bei den *gemischten Arten* (wahrscheinlich jedoch *Dryopteris austriaca*, wie MAIZITE 1942 bemerkt). Ob ein Unterschied in der Zusammensetzung des Rohaspidins und dem Gehalt an verschiedenen Phlorogluzinderivaten zwischen den beiden genannten Arten besteht, geht indessen aus diesen Untersuchungen nicht hervor. Da die beiden Arten eine ausgedehnte Anwendung als Wurmmittel haben, schien mir die Frage einer näheren Untersuchung wert, trotz der Schwierigkeiten, die einer chemischen Bestimmung jener verhältnismässig unbekannten Stoffe entgegenstehen.

Eine vorläufige Mitteilung über die Resultate meiner diesbezüglichen Untersuchungen wurde im Jahre 1939 in den Zeitschriften *Pharmacia* und *Suomen Apteekkariyhdistyksen Aikakauslehti* veröffentlicht. Drei Jahre später, 1942, erschien im Archiv der Pharmacie das Autoreferat einer Arbeit von MAIZITE, betitelt »Zur Kenntnis der kristallinischen Farnbestandteile», woraus hervorgeht, dass auch er sich seit einer langen Reihe von Jahren mit dem gleichen Problem beschäftigt hat. Da aber diese Untersuchungen in verschiedenen Nummern der *Acta Universitatis Latviensis* gedruckt sind, die mir infolge der herrschenden Umstände unzugänglich gewesen sind, bin ich lediglich auf das genannte Referat seiner Arbeiten angewiesen.

##### A. Isolierungsmethoden.

Da die Untersuchungen die chemisch-pharmakognostische Unterscheidung der beiden nahe verwandten Arten *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* bezweckten, war es natürlich von grösster Wichtigkeit, absolut reine und ungemischte Rhizomproben zu erhalten. Darum sammelte ich das Material zum grössten Teil selbst ein. Nur aus Joensuu ging mir fremdes Material zu, ich prüfte es aber genau nach und bestimmte sämtliche Rhizome einzeln nach der Art. Das Einsammlungsdatum dieses letzteren Materials kann ich

indessen nicht angeben, auch nicht, wie lange die Wurzelstücke frisch aufbewahrt worden waren, bevor sie getrocknet wurden.

Die Rhizome wurden 4—5 Wochen lang bei gewöhnlicher Zimmertemperatur getrocknet. Die Isolierung der Phlorogluzinderivate erfolgte jeweils aus 0.5—2 kg Trockenmaterial. Ausserdem gelangten zwei frische Rhizomproben zur Untersuchung.

POULSSON und HAUSMANN, wie auch MAIZITE, haben sich des von BOEHM (1897) entwickelten Verfahrens zur Rohfilizin- bzw. Rohaspidinherstellung bedient. Demselben gemäss wird das Ätherextrakt der Rhizome mit so viel Magnesiumoxyd versetzt, dass sich ein trockenes Pulver ergibt, wonach dieses mit reichlich Wasser ausgelaugt wird. Dabei werden die sauren Phlorogluzinderivate in lösliche Magnesiumsalze übergeführt. Diese werden aus der Wasserlösung erneut mit Säure ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert und getrocknet, und so erhält man das Rohfilizin bzw. Rohaspidin als ein braunes Pulver.

In der vorliegenden Untersuchung erfolgt die Rohaspidinbereitung gemäss dem Prinzip von BOEHM, doch mit einem wichtigen Unterschied, der in meiner vorläufigen Mitteilung nicht angegeben ist, der aber jetzt, nachdem die Arbeiten abgeschlossen sind, mitgeteilt werden möge. Die bisherigen Autoren haben stets, sofern sie nicht direkt von dem Ätherextrakt ausgegangen sind, dieses dargestellt und danach die Arbeit auf dem von Boehm eingeschlagenen Wege fortgesetzt. Hier ist im Anschluss an die Untersuchungen eine andere Methode zur Isolierung der Phlorogluzinderivate direkt aus den Wurzelstücken ausgearbeitet, indem das Boehmsche Verfahren umgekehrt ist. Die Methode ist folgende.

*Darstellung von Rohaspidin.* — Die grobpulverisierten Wurzelstücke wurden mit so viel MgO gemischt, dass auf 1 kg derselben 200 g MgO kamen, und danach mit 30 l Leitungswasser versetzt. Nachdem das Gemisch von Zeit zu Zeit umgerührt worden war, blieb es über Nacht stehen, worauf die gewöhnlich blutrote, selten helle Lösung durch einen grossen Saugtrichter abgegossen und filtriert wurde. Das abfiltrierte Drogenpulver wurde erneut auf dieselbe Weise mit einer ebenso grossen Wassermenge wie vorher ausgelaugt und nach einigen Stunden filtriert. Die Filtrate wurden unmittelbar mit verdünnter Salzsäure angesäuert, wobei die dunkle Farbe der Lösung in ein helles Gelb überschlug, während die Phlorogluzinderivate als fleischrote bis nahezu weisse Flocken ausgefällt wurden, die gewöhnlich alsbald zu Boden sanken und sich dadurch bequem, zuerst durch Dekantieren, dann durch Filtrieren mit einem Saugtrichter, von der Lösung abtrennen lassen. Auf diese Weise ergab sich die Hauptmasse der sauren Bestandteile. Ein drittes Auslaugen des Drogenpulvers mit Wasser erübrigte sich gewöhnlich, wie dadurch festzustellen war, dass bei dem Ansäuern des zweiten Fil-

trats mit Salzsäure nur ein unbedeutender Niederschlag entstand. Der fleischrote bis nahezu weisse Niederschlag wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und dann in noch feuchtem Zustand zusammen mit dem Filter — der Niederschlag verdunkelte sich sogar, wenn er bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet wurde — in Äther aufgenommen und zusammen mit getrocknetem Natriumsulfat so viele Male (etwa 5—6 mal mit ugf. 100 ml) mit Äther durchgeschüttelt, dass sich die Ätherschicht fast gänzlich entfärbte. Dabei blieb ein grosser Teil des Niederschlags ungelöst zurück. Von den vereinigten Ätherschichten wurde der Äther zum grössten Teil abdestilliert, wonach man die restliche, stark konzentrierte Lösung über Nacht in offenen Gefässen stehenliess, wobei das gewonnene Rohaspidin bei Gegenwart von Aspidin kristallinisch ausgeschieden wurde. Anderenfalls ergab sich ein schwarzbrauner homogener Rückstand. Diese Herstellungsmethode hat gegenüber dem Boehmschen Verfahren den grossen Vorzug, dass sich die Bereitung des Ätherextraktes erübriggt, ein Umstand, der in der Praxis, bei der Behandlung grösserer Rhizomquantitäten, von grosser Bedeutung sein kann.

Das in obiger Weise dargestellte Rohaspidin wurde weiter nach BOEHM (1897) und HAUSMANN (1899) untersucht.

*Darstellung von Aspidin.* — Das nach dem obigen Verfahren dargestellte Rohaspidin wurde mit einer geringen Menge absoluten Alkohols verrührt und der dabei ungelöste Aspidinniederschlag abfiltriert. Die konzentrierte Alkohollösung liess man 2—3 Wochen stehen und filtrierte dann von dem erneut ausgeschiedenen Aspidin ab. Die vereinigten Aspidinniederschläge wurden hiernach durch Umkristallisieren aus 96 % Alkohol gereinigt. Das Aspidin liess sich leicht in reiner Form nach 2—3maligem Umkristallisieren in Form von strohgelben, für das blosse Auge nadelförmigen Kristallen gewinnen, die sich bei langsamer Ausbildung zu schönen Rosetten anhäuften. Im Mikroskop traten sie als lange Prismen hervor, als deren Schmelzpunkt 125° gefunden wurde. Im übrigen wurde völlige Übereinstimmung mit BOEHMS Aspidin konstatiert, so dass auf eine Elementaranalyse zur Bestätigung der Identität verzichtet werden konnte. Dasselbe gilt auch von den nachfolgenden Stoffen, deren Darstellung, vom Rohaspidin ausgehend, nach Boehm erfolgt ist.

*Darstellung von Flavaspidsäure.* — Die alkoholische Mutterlauge wurde durch Eindunsten in offener Porzellanschale auf dem Wasserbad vom Alkohol befreit. Der Rückstand wurde in 20 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung gelöst und mit Äther so lange durchgeschüttelt, bis sich nur noch eine schwach gelbgefärbte Ätherschicht ergab. Der Äther wurde nun von den vereinigten Ätherschichten abdestilliert und der rotbraune harzige Rückstand mit wenig Wasser verrührt,

so dass sich ein emulsionsartiges Gemisch bildete. Bei Zugabe von 10 %  $\text{CaCl}_2$ -Lösung klärte sich die Lösung unter Ausfällung von Harz auf. Das Harz wurde durch einen Saugtrichter abfiltriert und mit Wasser ausgelaugt, indem man es mehrmals im Mörser mit kleinen Wassermengen verrieb und erneut filtrierte. Die vereinigten schwach gelben Wasserextrakte wurden mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure angesäuert und eiuigemal mit Äther durchgeschüttelt. Dabei löste sich der bei der Ansäuerung entstandene Niederschlag im Äther auf. Der Äther wurde nun abdestilliert und der Rückstand mit absolutem Alkohol überschichtet. Die sich dann allmählich bildende Kristallmasse von Flavaspidsäure wurde am folgenden Tage abgesaugt und aus Methylalkohol umkristallisiert und schliesslich gewogen. Dicke, schön zitronengelbe Prismen, von deren Schmelzpunkt im folgenden Abschnitt näher die Rede sein wird.

*Übrige Phlorogluzinderivate.* — *Albaspidin.* Mehrere früher erwähnte Forscher, wie BOEHM, POULSSON und MAIZITE, geben an, dass sie bei der Isolierung des Aspidins stets mit grossen Schwierigkeiten zu kämpfen hatten, wenn es galt, diesen Stoff von dem gleichzeitig auskristallisierenden Albaspidin zu trennen. Ich selbst erhielt bei meinen oben beschriebenen Versuchen in den meisten Fällen sowohl aus *Dryopteris spinulosa* als aus *D. austriaca* nur Aspidin, wie durch Kontrollieren des Niederschlags im Mikroskop festgestellt werden konnte. Die Ursache dazu kann ich nicht angeben, möglich ist aber, dass ich mit so kleinen Rhizomproben (0.5—2 kg, wie oben erwähnt) arbeitete, dass die in ihnen enthaltene unbedeutende Albaspidinmenge bei den Analysen nicht zum Vorschein kam. Das Albaspidin kristallisiert nämlich, wie konstatiiert wurde und wie auch die obenerwähnten Autoren andeuten, sehr unvollständig aus. Dass es jedoch in sämtlichen Proben ebenfalls zugegen war, liess sich, wie aus dem folgenden Teil der Untersuchung hervorgehen wird, durch Mikrosublimation nachweisen.

Bei meinen Untersuchungen war Albaspidin nur aus den Joensuu-Proben von *Dryopteris spinulosa* (Probe Nr. 6) und *D. austriaca* (Proben Nr. 6—8) desgleichen aus den beiden frisch untersuchten Rhizomproben der letzteren Art aus Nyland zu gewinnen.

Aus den ebengenannten aspidinhaltigen Rhizomen ergab sich das Albaspidin nach dem folgenden Verfahren. Der erste, bei der Verührung des Rohaspidins mit Alkohol erhaltene Niederschlag bestand offensichtlich aus reinem Aspidin, da der konstante Schmelzpunkt,  $125^\circ$ , schon nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol erreicht wurde. Die konzentrierte Mutterlauge, die auf übliche Weise etwa nach zwei Wochen filtriert wurde, hatte jedoch einen Niederschlag gebildet, der sich nach dem Umkristallisieren als eine Mischung von Aspidin und Albaspidin erwies. Die Stoffe wurden durch

fraktioniertes Umkristallisieren aus Alkohol voneinander getrennt, wodurch die letzten Reste des Aspidins vom Albaspidin gesondert wurden. Die Ausbeute an Albaspidin betrug bei sämtlichen Proben gegen 0.01 %, aus der Masse der getrockneten Rhizome berechnet.

Die aus Joensuu stammenden *Dryopteris austriaca*-Proben (Nr. 6—8) enthielten, wie unten hervorgeht, nicht Aspidin, sondern es wurden bei der ersten Behandlung des Rohaspidins mit absolutem Alkohol reichliche Mengen von Flavaspidsäure auskristallisiert. Beim Umkristallisieren der letzteren aus Methylalkhol verblieb jedoch ein in dem heissen Methylalkohol unlöslicher Rest, der sich nach Umkristallisierten aus 96% Alkohol als Albaspidin erwies. Die Ausbeute betrug auch in diesem Falle rund 0.01 %.

In Anbetracht der eingangs erwähnten Neigung des Albaspidins zu unvollständigem Auskristallisieren müssen besonders diese Werte als zu niedrig betrachtet werden.

Das so erhaltene Albaspidin hatte den Mikroschmelzpunkt 149°—150° und wurde in Form von feinen, weissen Nadeln gewonnen.

*Aspidinol.* Das Aspidinol ist von sämtlichen früheren Forschern nur in geringen Mengen in den *Dryopteris*-Rhizomen nachgewiesen worden. Darum wurde der Aspidinolgehalt nicht aus den einzelnen Proben, sondern erst nach Vereinigung der harzartigen Rückstände nach Isolierung der Flavaspidsäure aus einer grösseren Anzahl Proben (für *Dryopteris spinulosa* aus den Proben Nr. 1—7 und für *D. austriaca* aus den Proben Nr. 1—8) gemeinsam bestimmt. Diese bei Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gewonnenen gemeinsamen Harzniederschläge wurden dann nach BOEHM (1897) weiter verarbeitet, indem man sie unter dem Rückflusskühler etwa 3 Stunden lang mit Benzol auskochte und die Benzollösung abfiltrierte. In dieser kristallisierte das Aspidinol allmählich in Form von feinen Nadeln aus, die abfiltriert, nach Boehm mit Ligroin gereinigt und aus Xylol und schliesslich erneut aus Benzol umkristallisiert wurden. Mikroschmelzpunkt 143°. Ausbeute: *Dryopteris spinulosa* 0.08 %, *D. austriaca* 0.012 %.

*Phloraspin.* Eine Substanz, die in ihren Eigenschaften mit dem von BOEHM (1903 d) beschriebenen Phloraspin übereinstimmte, ergab sich bisweilen als Verunreinigung bei der Aspidinoldarstellung sowohl aus *Dryopteris spinulosa* als aus *D. austriaca*. Das Aspidinol wurde vom Phloraspin in der Weise getrennt, dass man es in kaltem Alkohol auflöste und das ungelöst zurückgebliebene Phloraspin abfiltrierte. Dieses reinigte man dann nach Boehm durch Auflösen in Azeton und erneute Ausfällung bei Zusatz von destilliertem Wasser, wonach der Niederschlag abfiltriert und getrocknet wurde. Schmelzpunkt 211°.

Boehm gewann diesen Stoff in etwa 0.15 % vom Extrakt; in zahlreichen Extraktproben fehlte er aber völlig.

*Aspidinin.* Diesen Stoff versuchte ich nach den Anweisungen von BOEHM (1897) vergebens in den untersuchten *Dryopteris*-Rhizomen zu erfassen. Boehm führt keine Zahlen an, er bemerkt bloss, dass er nur ganz kleine Mengen vorgefunden habe. POULSSON gibt den Polystichiningehalt (= Aspidinin?) mit  $\frac{1}{3}\%$  vom Extrakt an. MAIZITE erwähnt ebenso Aspidinin aus *Dryopteris austriaca*.

*Bestimmung des Rohaspidingehaltes.* — Der Rohaspidin gehalt wurde in besonderen Proben der Droge zu 20 g nach dem oben dargestellten Verfahren mit MgO auf folgende Weise bestimmt.

20 g der pulverisierten Droge wurden mit 4 g MgO gemischt und mit 400 g destillierten Wassers ausgelaugt, das Gemisch nach 24 Stunden filtriert und von neuem mit der gleichen Wassermenge ausgelaugt, das Filtrat unmittelbar mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure angesäuert, der dabei entstandene Niederschlag abfiltriert und zusammen mit dem Filter nebst 2 g getrockneten Natriumsulfats dreimal mit 30 g Äther durchgeschüttelt. Aus den vereinigten Ätherschichten wurde der Äther verdunstet und dann das zurückgebliebene Rohaspidin während einer Stunde im Trockenschrank bei 100° getrocknet.

#### B. Resultate.

Die Mengen des auf diese Weise gewonnenen Aspidins und der Flavaspidsäure wurden für die beiden untersuchten *Dryopteris*-Arten aus einer Anzahl von Proben, die zu verschiedenen Zeiten des Jahres eingesammelt waren, bestimmt. Die Resultate dieser Bestimmungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Bestimmungen machen keinen Anspruch darauf, streng quantitativ zu sein, sie vermitteln uns aber immerhin einen ungefähren Begriff von dem Gehalt der Drogen an diesen Stoffen. Die Werte der Tabelle beziehen sich auf die getrockneten Rhizomproben. Später wurden noch zwei frische *Dryopteris austriaca*-Proben auf ihren Gehalt an Aspidin und Albaspidin untersucht, und zwar mit folgendem Resultat:

Probe I, eingesammelt in Pernå, Nyland, am 5. VIII. 1940: Aspidin 0.18 %, Albaspidin 0.01 %.

Probe II, eingesammelt auf der Insel Mölandet im Nyländischen Schärenhof: Aspidin 0.18 %, Albaspidin 0.01 %.

Diese Prozentzahlen gelten für die getrockneten Rhizome; von den frischen Rhizomproben wurde ein Teil zum Zweck dieser Berechnung getrocknet.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, war Aspidin normalerweise sowohl in *Dryopteris spinulosa* als in *D. austriaca* vorhanden; die einzelnen Mengenanteile weisen jedoch bedeutende Unterschiede auf. Den höchsten Gehalt,

Tabelle 1. Der Gehalt an Aspidin und Flavaspidsäure in einer Anzahl Proben von *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca*, eingesammelt zu verschiedenen Zeiten des Jahres.

Von den in der Tabelle angegebenen Orten liegen Munksnäs, Pernå, Degerö und Lojo in der Provinz Nyland in Südfinnland, Joensuu in Nordkarelien.

Nr. der Probe		Ort und Zeit der Einsammlung	Rohaspidin in % vom Rhizom	Aspidin in %		Flavaspidsäure in %	
				vom Rhizom	vom Rohaspidin	vom Rhizom	vom Rohaspidin
1938							
1.	<i>D. spinulosa</i>	Munksnäs 11.VI.	1,13	0,20	17,7	nicht untersucht	—
2.	—»—	Pernå 6.VII	1,33	reichlich	—	—»—	—
3.	—»—	Degerö 25.IX.	0,19	0,045	23,8	0,005	2,6
4.	—»—	» 2.X.	0,71	0,18	25,8	0,023	3,2
5.	—»—	» 2.X.	0,98	0,22	22,4	0,030	3,0
6.	—»—	Joensuu Herbst	0,75	0,17	22,7	0,036	4,8
7.	—»—	Degerö 23.X.	0,71	0,12	17,0	0,012	1,7
<i>D. austriaca</i>							
1.	Lojo	5.VI.	1,12	0,19	16,9	nicht untersucht	—
2.	—»—	Munksnäs 11.VI.	1,47	0,39	27,2	0,08	5,4
3.	—»—	Pernå 15.VII.	1,04	0,15	14,4	0,054	5,2
4.	—»—	» 15.VII.	1,10	0,17	15,4	0,046	4,2
5.	—»—	Degerö 2.X.	0,51	0,06	11,8	0,03	5,8
6.	—»—	Joensuu Herbst	0,50	fehlend	—	0,20	40,0
7.	—»—	» »	nicht untersucht	»	—	0,12	—
8.	—»—	» »	0,50	»	—	0,17	34,0
1940							
9.	—»—	Pernå 5.VIII.	nicht untersucht	0,25	—	nicht untersucht	—

0,39 %, ergab eine im Vorsommer eingesammelte *D. austriaca*-Probe (Nr. 2), im allgemeinen bewegte er sich jedoch zwischen 0,1 und 0,2 %, entsprechend ugf. 20 % des Rohaspidins. Die bemerkenswerteste Abweichung wiesen die im Herbst 1938 bei Joensuu eingesammelten *D. austriaca*-Proben (Nr. 6—8) auf, in denen sich nach der oben beschriebenen Methode überhaupt kein Aspidin nachweisen liess. Die entsprechende *D. spinulosa*-Probe (Nr. 6) enthielt dagegen den normalen Betrag Aspidin, etwa 0,2 %. Jene Joensuu-Drogen wichen, wie vorher gezeigt ist, auch in anderer Beziehung von allen meinen anderen Proben ab.

Flavaspidsäure wurde in sämtlichen untersuchten Proben festgestellt, und sie dürfte daher sowohl bei *Dryopteris spinulosa* als bei *D. austriaca* als ein konstant vorkommender Bestandteil angesehen werden können. Der Gehalt schwankte gewöhnlich zwischen 0,02 und 0,05 % vom Rhizom oder 2—5 % vom Rohaspidin. Abnorm hoch war der Flavaspidsäuregehalt bei den schon

wiederholt besprochenen *D. austriaca*-Proben Nr. 6—8 aus Joensuu, die des Aspidins total entbehrten, dafür aber 0.2 % Flavaspidsäure (nahezu 40 % vom Rohaspidin) enthielten. Schon bei der ersten Alkoholbehandlung des aus diesen Proben gewonnenen Rohaspidins kristallisierten hier grosse Mengen von Flavaspidsäure statt Aspidin aus.

### C. Zusammenfassung der Resultate.

Die oben wiedergegebenen Untersuchungen haben den Charakter von orientierenden Versuchen. Sie sollten lediglich dazu dienen, die Eignung der von mir entwickelten Isolierungsmethode für eine auf breiterer Basis angelegte Untersuchung zu prüfen. Infolge äusserer Umstände konnte dieser Plan jedoch nicht verwirklicht werden, sondern das Arbeitsprogramm musste dahin abgeändert werden, dass es weniger zeitraubende und leichter durchführbare Untersuchungen umfasste.

Überblickt man die Ergebnisse dieser Untersuchungen über die Phlorogluzinderivate der Arten *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca*, so hat man den Eindruck, als bestände im Vorkommen dieser Stoffe zwischen den genannten Arten kein wesentlicher Unterschied. So konnten aus den beiden Arten sowohl Aspidin, Flavaspidsäure, Albaspidin, Aspidinol wie Phloraspin gewonnen werden. Sieht man von den abweichenden Joensuu-Drogen ab, deren Einsammlungsdatum und Aufbewahrungsweise mir nicht näher bekannt sind, so ergaben die Rhizome der beiden *Dryopteris*-Arten, in runden Zahlen ausgedrückt, folgende Mengenanteile der verschiedenen Phlorogluzinderivate (das Phloraspin wird hier wegen seiner geringen Ausbeute nicht berücksichtigt).

*Dryopteris spinulosa*: Aspidin 0.1—0.2 %, Flavaspidsäure 0.02—0.05 %, Albaspidin bis 0.01 % und Aspidinol 0.03 %.

*Dryopteris austriaca*: Aspidin 0.1—0.2 %, Flavaspidsäure 0.04—0.05 %, Albaspidin bis 0.01 % und Aspidinol 0.012 %.

*Vergleich mit früheren Untersuchungen.* — Da die früheren Autoren die beiden fraglichen *Dryopteris*-Arten nicht getrennt untersucht haben, ist ein direkter Vergleich der Resultate nicht möglich. Weil sich aber die Analysen sowohl von POULSSON als von BOEHM, wie MAIZITE (1942) bemerkte, wahrscheinlich auf *Dryopteris austriaca* beziehen, mögen ihre Resultate hier wiedergegeben werden.

Poulsson gibt folgende auf das Ätherextrakt bezogene Mengenanteile der verschiedenen Phlorogluzinderivate an: Polystichin (Aspidin) 1.4 %, Polystichalbin (Albaspidin) 0.3—0.4 %, Polystichozitrin (Flavaspidsäure?) 0.3 %, Polystichinin (Aspidinin?)  $\frac{1}{3}$  % oder vergleichshalber auf das Rhizom um-

gerechnet (die Extraktausbeute betrug 5,2 %): Aspidin 0,073 %, Albaspidin 0,016—0,021 %, Flavaspidsäure 0,016 %, Aspidinin 0,017 %.

Boehms Werte je Extrakt lauten: Aspidin 2—3 %, Albaspidin 0,3 %, Flavaspidsäure 1 %, Aspidinin (Gehalt nicht angegeben), Aspidinol 0,2—0,3 % oder umgerechnet auf das Rhizom unter Annahme einer mittleren Extrakt ausbeute von 8 %: Aspidin 0,16—0,24 %, Albaspidin 0,024 %, Flavaspidsäure 0,08 %, Aspidinol 0,016—0,024 %.

Wie man aus dem Obigen ersieht, stimmen die von mir gewonnenen Werte in den Grenzen der Vergleichsmöglichkeiten recht gut mit den Poulssonschen und Boehmschen überein.

MAIZITE (1942), der wie ich die beiden *Dryopteris*-Arten trennt untersucht hat, ist zu einigermassen abweichenden Resultaten gekommen. Nach ihm bestehen nämlich zwischen den beiden Arten sowohl im qualitativen wie im quantitativen Gehalt der Drogen an Phlorogluzinderivaten deutliche Unterschiede. Maizite fand als Hauptbestandteil bei *D. spinulosa* Albaspidin, während der Aspidingehalt stark zurücktrat. Direkt entgegengesetzt war das Verhalten bei *D. austriaca*, indem sich hier hauptsächlich Aspidin und nur in ganz geringen Mengen Albaspidin, außerdem aber noch Aspidinin ergab, welcher letztere Stoff bei der vorhergehenden Art gänzlich fehlte. Bei beiden Arten wurde dazu ein ungefähr gleich hoher Gehalt an Flavaspidsäure konstatiert. Maizite führt in seinem Referat nur für eine *D. austriaca*-Probe genauere Zahlenwerte an, und zwar: Aspidin 2,28 %, Albaspidin 0,38 %, Flavaspidsäure 0,013 %, bezogen auf das Extrakt, dessen Ausbeute 7,45 % betrug; auf das Rhizom umgerechnet, ergeben sich hieraus: Aspidin 0,17 %, Albaspidin 0,028 % und Flavaspidsäure 0,0097 %. Aspidinol konnte Maizite trotz zahlreicher Versuche bei den untersuchten Arten nicht nachweisen.

Leider gibt Maizite nicht die Grösse der analysierten Rhizomproben und mit Ausnahme der oben angeführten Probe auch nicht die Mengenanteile der einzelnen Phlorogluzinderivate in denselben an, was jedoch vom Standpunkt eines Vergleiches mit den von mir gewonnenen Werten unbedingt von Interesse wäre. Er weist allerdings auf seine Arbeiten in den Acta Universitatis Latviensis hin, wo möglicherweise nähere Angaben zu finden sind, die ich aber, wie bereits bemerkt, unter den obwaltenden Verhältnissen nicht aufzutreiben vermocht habe.

Der Hauptunterschied zwischen Maizites und meinen Resultaten betrifft *Dryopteris spinulosa*, wo Maizite Albaspidin als Hauptbestandteil und Aspidin nur in ganz geringen Mengen vorfand. Meinen eigenen Analysen gemäss fällt dagegen der Hauptanteil dem Aspidin zu, während das Albaspidin in untergeordneter Stellung auftritt. Wie dieser Unterschied zu erklären ist, kann einstweilen nicht entschieden werden. Doch sind im Laufe der Untersuchungen gewisse Umstände zutage getreten, die hierbei ohne Zweifel berücksichtigt zu

werden verdienen. Vor allem dürften in verschiedenen Gegenden eingesammelte Drogen sich in bezug auf die Zusammensetzung und den Gehalt an Phlorogluzinderivaten bedeutend voneinander unterscheiden. Dies hat Maizite (1942) für *D. austriaca* festgestellt, und dasselbe bezeugen auch meine Proben aus Joensuu. Daher dürfte es wohl kaum unmöglich und nicht einmal in höherem Grade unerwartet sein, wenn sich *D. spinulosa* bei uns von den entsprechenden Pflanzen in Lettland unterschiede. Dass Maizite geringe Mengen Aspidinin als für *D. austriaca* spezifisch gefunden hat, verwundert weniger, kann doch dieser Stoff mir bei meinen orientierenden Analysen leicht entgangen sein, genau so wie Maizite wahrscheinlich das Aspidinol übersehen haben mag, das sich ausser in meinem Material auch in den Analysen von BOEHM, HAUSMANN und KRAFT ergeben hat. Ein Faktor, dem beim Analysieren der Phlorogluzinderivate von Farnrhizomen sicher eine grosse Bedeutung beizumessen ist, ist die Zeit der Einsammlung und die Art der darauffolgenden Aufbewahrung, d. h. ob die Wurzelstücke unmittelbar nach der Einsammlung oder nach vorheriger Trocknung oder etwa erst nach längerem Liegen in feuchtem Zustand behandelt werden. Die unbeständigen Phlorogluzinderivate sind bei einer derartigen Aufbewahrung mannigfachen, noch nicht bekannten Veränderungen unterworfen. Weiter dürfte man sich wohl auch denken können, dass die von mir angewandte, von Maizite abweichende Methode zur Isolierung der Phlorogluzinderivate einigermassen verschiedene Resultate liefert.

## V. Mikrochemische Studien über die isolierten Phlorogluzinderivate.

Die Reihe der vortrefflich durchgeführten Konstitutionsbestimmungen von BOEHM (1898, 1899, 1901 a—c, 1903 a—d) mit den von ihm dargestellten kristallinischen Filixstoffen bildet eine bedeutsame Grundlage für die Erforschung dieser Substanzen. Boehm konnte diese Untersuchungen praktisch zum Abschluss bringen, so dass es ihm möglich war, für die meisten natürlichen Phlorogluzinderivate auch die Strukturformeln festzustellen, wenn diese auch in bezug auf gewisse Punkte noch nicht endgültig bestätigt bzw. zum Teil noch unklar sind. Im übrigen sind unsere Kenntnisse über die Eigenschaften und Reaktionen der kristallinischen Farnbestandteile mangelhaft und beschränken sich fast ausschliesslich auf die Erfahrungen und Befunde Boehms bei seinen Konstitutionsbestimmungen. Besonders gilt dies von allen mikrochemischen Reaktionen und Identitätsproben, die zum Nachweis dieser Stoffe in der Droge dienen sollten.

Von den speziellen Reaktionen, die in der Literatur (siehe THUNMANN-ROSENTHALER 1931) für die Phlorogluzingerbstoffe, d. h. Gerbstoffe mit einem

oder mehreren Phlorogluzinkernen, angegeben sind, gelten namentlich die Reaktionen mit Vanillinsalzsäure (Rotfärbung) und Dimethylaminobenzaldehydschwefelsäure (ebenso Rotfärbung) als besonders charakteristisch und speziell für die Phlorogluzinkerne bezeichnend. Auch in der finnischen Pharmacopöe ist Rotfärbung der Schnittfläche von *Rhizoma Filicis* mit Vanillinsalzsäure als Identitätsbeleg der Droge angegeben. Diese Reaktionen werden jedoch bei den aus den Farnrhizomen isolierten anthelmintischen Phlorogluzinderivaten völlig vermisst, wie ich bei vorgenommenen Versuchen feststellen konnte. Eine Rotfärbung tritt nicht ein, sondern die Phlorogluzinderivate werden bei Zusatz der sauren Reagenzien lediglich als dicker Niederschlag ausgefällt. Die bei den Versuchen verwendeten Reagenzien waren hergestellt: Vanillinsäure nach der finnischen Pharmacopöe aus 1 Gewichtsteil Vanillin und 9 Gewichtsteilen Spiritus, davon 1 Gewichtsteil auf 9 Gewichtsteile Chlorwasserstoffsäure; Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens aus 0.5 g Dimethylaminobenzaldehyd + 8.5 g konz. Schwefelsäure + 8.5 g dest. Wasser.

Man sucht also in der pharmakognostischen Literatur vergebens nach Spezialreagenzien für die teniziden Phlorogluzinderivate. Weder unsere eigene noch andere Pharmacopöen führen Proben zum Nachweis dieser Substanzen in *Rhizoma Filicis* an, obwohl die Phlorogluzinderivate zu den wirksamen Bestandteilen der Droge gerechnet werden müssen.

Nachstehend gebe ich eine Übersicht der allgemeinen Eigenschaften der von mir isolierten Phlorogluzinderivate in Anlehnung an frühere Quellen (vornehmlich BOEHM) und eine Beschreibung der mikrochemischen Versuche, die ich mit den verschiedenen Farnbestandteilen ausgeführt habe und die dem Zweck dienen sollten, den mikrochemischen Nachweis derselben in der Droge zu ermöglichen.

#### A. Arbeitsmethodik.

Einige orientierende Versuche führten zu der Auffassung, dass das beste Verfahren, das zur Durchführung des aufgestellten Arbeitsprogramms zu Gebote stand, die Mikrosublimationsmethode war, der sich verschiedene Autoren in letzter Zeit mit Erfolg zur Beschreibung von Drogensublimaten bedient haben.

Die Mikrosublimation ist als Untersuchungsmethode bei der Charakterisierung von Drogen schon seit langem bekannt und ist früher vor allem von TUNMANN (siehe TUNMANN-ROSENTHALER 1931) angewandt worden, der in zahlreichen verdienstvollen Arbeiten verschiedene Drogensublimate beschrieben hat. Aber erst als KOFLER (1934) die Mikroschmelzpunktbestimmung als Hilfsmittel zur Identifizierung der Sublimatkristalle herangezogen hatte, wurde ein fester Grund für diesen Forschungszweig geschaffen. Es gelang Kofler

mittels seines neuen Verfahrens mehrere bisherige Irrtümer zu berichtigen, und neuerdings ist KARMA (1938 a—c, 1939) mit der Methode bei der Charakterisierung verschiedener Drogensublimate zu ausgezeichneten Resultaten gelangt.

Die Methodik der Mikrosublimation ist in mehreren Handbüchern beschrieben, so z. B. in Tunmann-Rosenthalers »Pflanzenmikrochemie« (1931), worauf hier verwiesen sei.

Die in der vorliegenden Untersuchung ausgeführten Mikrosublimationsanalysen gründen sich auf folgende Arbeitsmethode.

Die Mikrosublimationen erfolgten im Mikroschmelzpunktapparat von Kofler (1934), der Sublimation unter gleichen äusseren Verhältnissen gestattet. Im übrigen wurde die von MOLISCH (siehe Tunmann-Rosenthaler) beschriebene sog. Glaskammermethode befolgt, bei der ein kleiner Teil der zu untersuchenden Substanz oder des Drogenpulvers auf einen Objektträger gebracht, dort mit einem 3—4 mm hohen Glasring umgeben und zum Auffangen des Mikrosublimats mit einem anderen Objektträger bedeckt wird. Das Ganze wird dann auf der Wärmeplatte in Koflers Apparat erhitzt, wobei die Sublimationstemperatur bequem an dem daselbst angebrachten Thermometer abgelesen werden kann. Die Resublimationen wurden auf gleiche Weise ausgeführt.

Bei Vakuumsublimation bediente man sich der von FISCHER (1934) konstruierten Mikrovakuumglocke, im übrigen erfolgten die Vakuumsublimationen gemäss den Arbeitsvorschriften Fischers im Koflerschen Apparat. Die Temperatur wurde an dem Wärmeplattenthermometer abgelesen. Die Vakuumsublimationen wurden im allgemeinen bei ungefähr 10 mm Vakuum ausgeführt.

Die Schmelzpunktbestimmungen fanden im Mikroschmelzpunktapparat von Kofler statt. Die Schmelzpunktangaben gelten für den jeweils höchsten der gefundenen Parallelwerte, wobei natürlich eben dieser für die Identitätsbestimmung der betreffenden Substanz ausschlaggebend ist. Selbstverständlich ergeben sich bei den Bestimmungen ausserdem stets auch niedrigere Werte.

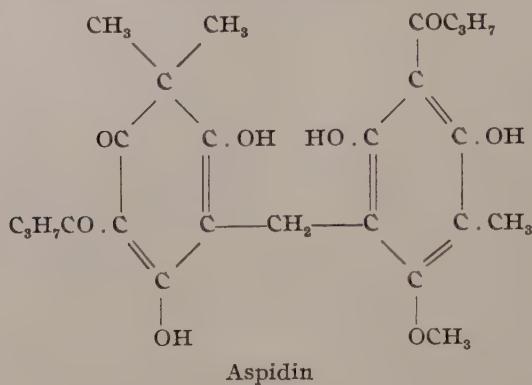
## B. Versuche mit den isolierten Phlorogluzinderivaten.

### 1. Aspidin.

Das Aspidin löst sich schon bei gewöhnlicher Zimmertemperatur leicht in Benzol, Äther, Essigäther und Petroläther und bei Erwärmung auch in Äthyl- und Methylalkohol, nicht dagegen in Wasser. Auch löst es sich mit Leichtigkeit in Alkalien und Ammoniak zu einer gelben Lösung. Durch Umkristallisieren aus Alkohol lässt es sich in Form von strohgelben Prismen gewinnen, die sich bei langsamer Kristallisation zu schönen sternförmigen Drusen

anhäufen. Die Alkohollösung wird bei Zusatz von ein paar Tropfen Ferrichloridlösung (*Spiritus ferri chloridi*) tiefrot.

Das Aspidin schmilzt scharf bei 124°—125° zu einer klargelben Lösung, ohne bei Abkühlung wieder kristallinisch zu erstarren. Die Strukturformel wird von BOEHM (1903 c) folgendermassen angegeben:



*Mikrochemie.* Werden ein paar Kristalle des Stoffes auf einem Objektträger unter das Deckglas gebracht, wonach man einen Tropfen Alkohol zusetzt, und wird das so erhaltene Präparat vorsichtig auf Koflers Wärmeplatte erhitzt, bis Auflösung der Kristalle eintritt, so kristallisiert das Aspidin bei der Wiederabkühlung in Form von zierlichen Nadelbüscheln aus (Abb. 9).

*Mikrosublimation.* Bei Mikrosublimation unter gewöhnlichem Luftdruck bilden sich Sublimate erst, nachdem sich der Stoff nach dem Schmelzen unter gleichzeitigem Zerfall missgefärbt hat. Die auf diese Weise erhaltenen Sublimate waren von tropfiger Form, und aus ihnen liessen sich nur ausnahmsweise bei Zusatz eines Tropfens Alkohol Aspidinkristalle (Abb. 10) gewinnen. Wurden diese gewaschen, indem man an dem einen Rande des Deckglases etwas Alkohol zutropfete und es an dem anderen wieder mit einem Filterpapierstreifen absog, so konnte für sie der richtige Schmelzpunkt (124°) bestimmt werden. Dieses Verfahren zur Schmelzpunktbestimmung ist von FRISCHER (1934) näher beschrieben worden.

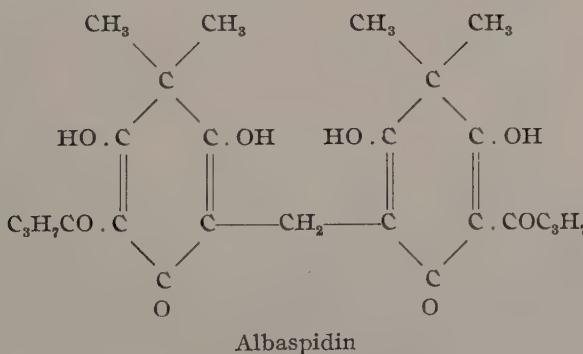
Bei Sublimation im Vakuum bildeten sich nach dem Schmelzen tropfige Sublimate, in denen vereinzelte Kristallnadeln zu beobachten waren. Bei Zusatz von Alkohol wurden fast unmittelbar reichliche Kristalle (Abb. 11) gebildet, die wie oben mit Hilfe des Mikroschmelzpunktes (124°) identifiziert werden konnten. Wie man aus den Abbildungen sieht, ergab sich das Aspidin in den Sublimenten in Form von viel feineren Kristallen als beim Umkristallisierten der reinen Substanz.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, dass das Aspidin bei Sublimation unter normalem Luftdruck zum grössten Teil zerfällt, im Vakuum dagegen ohne Zerfall sublimiert und im Vakuumsublimat durch Zusatz von Alkohol nachgewiesen werden kann.

## 2. Albaspidin.

Die Löslichkeitsverhältnisse des Albaspidins sind denjenigen des Aspidins ähnlich, doch löst sich das Albaspidin bedeutend schwerer in Äthylalkohol und Petroläther und besonders schwer in Methylalkohol, das auch beim Kochen nur unbedeutende Mengen des Stoffes zu lösen vermag. Aus Äthylalkohol umkristallisiert, lässt es sich in Form kleiner, feiner, oft undeutlicher Nadeln gewinnen, die auf dem Filtrierpapier blendend weisse, seidenglänzende Überzüge bilden. Die Alkohollösung färbt sich mit Ferrichloridlösung braunrot.

Schmelzpunkt 149°. Die Schmelze erstarrt bei der Abkühlung wieder kristallinisch unter Bildung von kleinen, scharfen Nadeln. In der Strukturformel ist die gegenseitige Stellung der Hydroxyl- und Karbonylgruppen nach BOEHM (1901 c) noch unklar. Von den hierbei möglichen Formeln geben KARRER & WIDMER (1920) und TSCHIRCH (1923) folgende von Boehm aufgestellte Formel wieder:



*Mikrochemie.* Beim Umkristallisieren aus heissem Alkohol ergab sich das Albaspidin als feinkörniger, undeutlich kristallinischer Niederschlag oder in Form von meistens kleinen, kurzen und geraden, vereinzelten oder sternförmig angehäuften Nadeln (siehe Abb. 15).

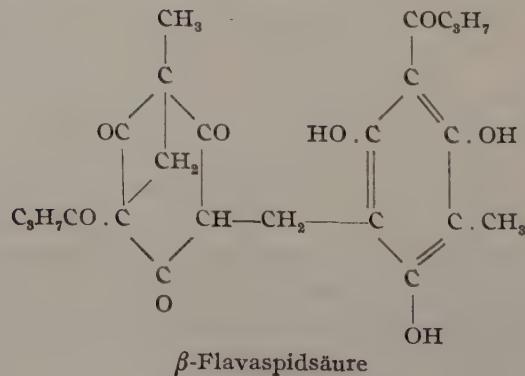
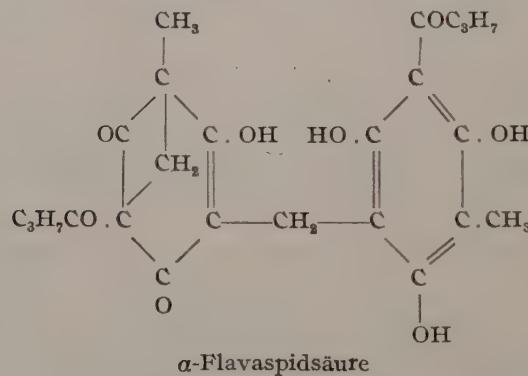
*Mikrosublimation.* Unmittelbar vor der Erreichung des Schmelzpunktes bildeten sich Sublimate von nadelförmigen Kristallen (Abb. 12) und nach weiterer Erhitzung (bis 200°) ähnliche kristallinische (Abb. 13 und 14) oder oft nur amorphe Sublimate. Beim Umkristallisieren der letzteren durch Zusatz

von einem Tropfen Alkohol bildeten sich typische Albaspidinkristalle (Abb. 15). Der Schmelzpunkt der Sublimatkristalle war  $149^{\circ}$ .

Die Sublimationsversuche zeigen also, dass das Albaspidin unter normalem Luftdruck ohne Zerfall sublimiert.

### 3. Flavaspidsäure.

Die Flavaspidsäure zeigt in bezug auf ihre Löslichkeitsverhältnisse eine grosse Ähnlichkeit mit dem Aspidin, löst sich aber in Äthyl- und Methylalkohol viel leichter als dieses. Das Umkristallisieren erfolgt am vorteilhaftesten aus Methylalkohol, wobei sich goldgelbe Prismen bilden. Ferrichloridlösung färbt die Alkohollösung tiefrot. Die Flavaspidsäure tritt in zwei Formen, einer Enol- und einer Ketoform ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Flavaspidsäure), auf, für welche BOEHM (1901 c, 1903 b) nachstehende Formeln angibt:



Nach Boehm (1901 c) erhält man die  $\alpha$ -Form mit dem Schmelzpunkt  $92^{\circ}$  durch Umkristallisieren aus Methyl- und Äthylalkohol, die  $\beta$ -Form, Schmelzpunkt  $156^{\circ}$ , dagegen durch Umkristallisieren aus Benzol, Xylool oder Eisessig.

Boehm beobachtete auch, dass die  $\alpha$ -Flavaspidsäure bei Erhitzung in ihre  $\beta$ -Form überging. Ich erhielt bei der Mikroschmelzpunktbestimmung meines aus Methylalkohol umkristallisierten Materials den Wert 94° für die Flavaspidsäure, die bei fortgesetztem Erhitzen erneut auskristallisierte und schliesslich bei 156°—157° schmolz.

*Mikrochemie.* Beim Umkristallisieren aus Äthylalkohol auf dem Objektträger wurden blattartige stumpfe Kristallnadeln (Abb. 16) gebildet; bei stärkerer Verdünnung bildeten sich runde Kristalldrusen (Abb. 17). Der Mikroschmelzpunkt der ersteren war 156°—157°, derselbe also wie für  $\beta$ -Flavaspidsäure. Für die andere Kristallform wurden Schmelzpunktwerte zwischen 82° und 93° erhalten; dieselben deuten also offensichtlich auf  $\alpha$ -Flavaspidsäure, was sich noch daraus ergab, dass sich in der Schmelze bei fortgesetzter Steigerung der Temperatur allmählich Kristalle bildeten, die schliesslich beim Schmelzpunkt der  $\beta$ -Säure schmolzen.

Der doppelte Schmelzpunkt der Flavaspidsäure kann am leichtesten und besten bei der Mikroschmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop verfolgt werden. So wurde bei aus Methylalkohol umkristallisierten Proben beobachtet, wie sich von 85° an kleine Bläschen an den Kristallen bildeten, wonach diese bei 94°, dem Schmelzpunkt der  $\alpha$ -Flavaspidsäure, schmolzen. Alsdann kristallisierten aus dem geschmolzenen Produkt von etwa 110° aufwärts kleine prismatische Kristalle aus, die bei fortgesetzter Temperatursteigerung weiterhin an Grösse zunahmen und sich zu Drusen zusammenschlossen (Abb. 18). Als endgültiger Schmelzpunkt der  $\beta$ -Flavaspidsäure wurden 156°—157° gemessen. Nach der Abkühlung bildeten sich in der Schmelze oft, doch erst nach langem Stehen, Kristalle aus.

*Mikrosublimation.* Diese ergab bei normalem Luftdruck meistens tropfige Sublimate, in denen bisweilen spärliche kleine Kristallnadeln beobachtet wurden. Die Sublimatbildung trat erst bei einer Temperatur von 200° ein, und die Flavaspidsäure zerfiel dabei offenbar zum grössten Teil, da bei Alkoholzusatz zu den Sublimenten keinerlei Kristallbildung erzielt werden konnte.

*Wurde hingegen die Sublimation im Vakuum vorgenommen, so ging die Flavaspidsäure ungefähr bei 160° ohne Zerfall über und liess sich in den tropfigen Sublimenten mittels Alkohol in Form der oben beschriebenen Kristalldrusen der  $\alpha$ -Flavaspidsäure nachweisen, die sich nach einigen Minuten am Deckglasrand bildeten (Abb. 19 und 20). Nach vorherigem Waschen mit Alkohol konnte ihre Identität weiterhin durch den doppelten Schmelzpunkt bestätigt werden.*

#### 4. Filixsäure.

Um für die vorliegende Untersuchung Filixsäure zu erhalten, wurde dieser Stoff aus ein paar *Dryopteris filix mas*-Proben isoliert. Die Darstellungsmethode

des Rohfilizins war die gleiche wie bei der Gewinnung von Rohaspidin. Aus dem Rohfilizin wurde die Filixsäure nach HAUSMANN (1899) isoliert, indem man es in einer grösseren Quantität Azeton löste, dann 5—6 Wochen stehenliess und danach von der auskristallisierten Filixsäure abfiltrierte. Die Filixsäure wurde durch Umkristallisieren aus Essigäther gereinigt, woraus sie in Form von hellgelben Tafeln gewonnen wurde, für die sich der in der Literatur angeführte Schmelzpunkt 184° ergab.

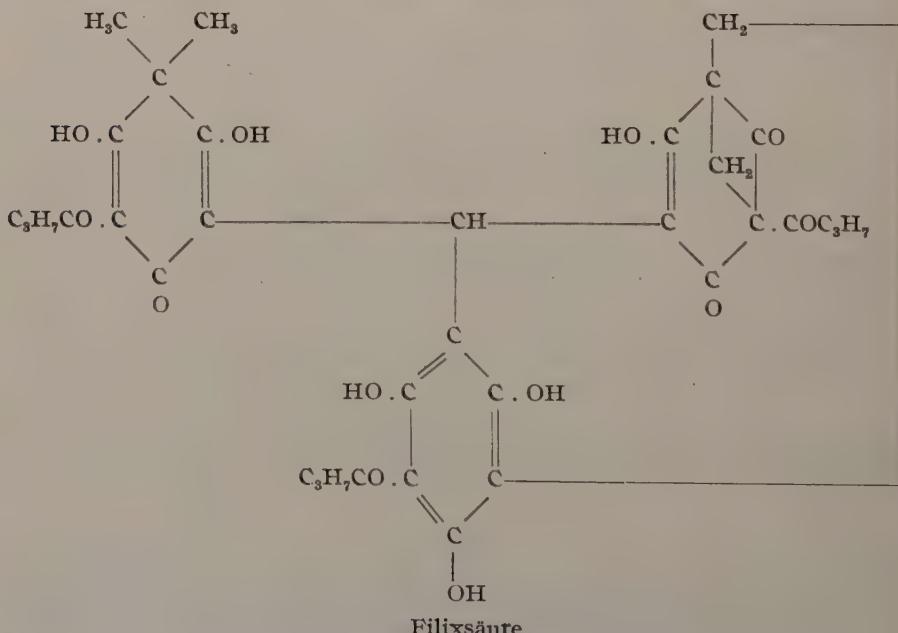
Zur Verwendung kamen getrocknete Rhizomproben von je 1 kg; die Behandlung erfolgte 4 Wochen nach dem Ersammeln. Die Ausbeuten an Filixsäure waren folgende:

Probe I, eingesammelt am 11. VI. 1938 in Munksnäs bei Helsingfors: Filixsäure je Rhizom 0.12 %, je Rohfilizin 10 %.

Probe II, eingesammelt am 7. VII. 1938 in Pernå: Filixsäure je Rhizom 0.11 %, je Rohfilizin 13.8 %.

Die Bestimmung des Rohfilizingehaltes fand hierbei auf die gleiche Weise wie die des Rohaspidingehaltes (siehe S. 17) statt.

Die Filixsäure ist leicht löslich in Chloroform und Kohlentetrachlorid, ziemlich leicht auch in Benzol und Xylool, schwer dagegen in Alkohol. Das Umkristallisieren geschieht am vorteilhaftesten aus Essigäther, woraus sich die Säure als bleichgelbe Tafeln mit dem Schmelzpunkt 184° gewinnen lässt. KARRER (1919) führt als wahrscheinliche Strukturformel der Filixsäure die nachstehende der zwei von BOEHM vorgeschlagenen Formeln an:



*Mikrochemie.* Sublimation unter Normaldruck ergab nach dem Schmelzen tropfige bis undeutlich kristallinische Sublimate (Abb. 21), die, mit einem Tropfen Alkohol behandelt, nadelförmige Kristalle lieferten (Abb. 22). Wurden diese ähnlich wie beim Aspidin auf dem Objektträger mit Alkohol gewaschen, so ergab sich für sie der Schmelzpunkt 142°. Die Schmelze erstarrte bei Abkühlung wieder kristallinisch zu kleinen, spitzen Nadeln. Dieser Umstand wie auch das Aussehen der Kristalle war wohl dahin zu deuten, dass man es mit Albaspidin zu tun hatte. Diese im ersten Augenblick überraschende Behauptung findet indessen ihre Erklärung darin, dass das Albaspidinmolekül im Filixsäuremolekül enthalten ist, wie aus einem Blick auf die Formel hervorgeht, weshalb man sich seine Abspaltung von demselben bei Erhitzung leicht denken kann. BOEHM (1901 c) hat nachweisen können, dass Albaspidin beim Kochen von Filixsäure mit Alkohol gebildet wird. Die angeführte Strukturformel der Filixsäure lässt sich wohl in diesen Gedankengang einfügen, kaum aber die andere von Boehm vorgeschlagene Formel. Auch der höchste gemessene Schmelzpunktwert, 142°, spricht keineswegs gegen diese Vermutung (der Schmelzpunkt des Albaspidins ist, wie oben angeführt, 149°), wiewohl freilich der richtige Wert nicht erzielt werden konnte.

Die Sublimationsversuche ergaben also, dass die Filixsäure bei der Erhitzung zerfällt, wobei Albaspidin gebildet wird.

Sublimation im Vakuum lieferte das gleiche Resultat wie Sublimation unter Normaldruck. Die Filixsäure zerfällt also auch beim Erhitzen im Vakuum, was eigentlich nicht befremdet, ist doch dieser Stoff wahrscheinlich der unbeständigste von allen Phlorogluzinderivaten der Filixdroge.

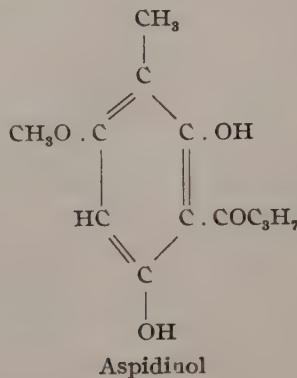
### 5. Aspidinol.

Das Aspidinol löst sich im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Phlorogluzinderivaten schon bei gewöhnlicher Zimmertemperatur in Alkohol. Es lässt sich am leichtesten aus Benzol oder Xylol umkristallisieren und wird dabei aus konzentrierter Lösung bei schneller Ausscheidung in Form von langen, farblosen, haarfeinen, ineinandergeschlungenen Fäden, bei langsamem Auskristallisieren wiederum in Form von dicken blassgelben Prismen oder Tafeln gewonnen. Ferrichloridlösung färbt die Alkohollösung intensiv schwarzgrün.

Der Schmelzpunkt des Aspidinols wurde früher von BOEHM (1897) mit 143° angegeben. Denselben Wert erhielt nach ihm auch HAUSMANN (1899). In einer späteren Veröffentlichung korrigiert jedoch Boehm (1901 b) seinen eigenen Wert und gibt nun als Schmelzpunkt des Aspidinols 156°—161° an mit der Bemerkung, dass minimale Verunreinigungen den Schmelzpunkt um ein Dutzend Grade herabdrücken können. Ich erhielt bei meinen Bestimmungen

gewöhnlich den Wert  $143^\circ$ . Nach wiederholtem sorgfältigem Umkristallisieren aus Benzol ergab sich schliesslich  $152^\circ$  als höchster Wert für das Aspidinol.

Das Aspidinol ist seiner Zusammensetzung nach das einfachste von allen natürlich vorkommenden anthelmintischen Phlorogluzinderivaten, indem es nur einen einzigen Phlorogluzinring enthält. Boehm (1903 a) gibt der Strukturformel folgende Form:



Das Aspidinol ist unter den kristallinischen Filixstoffen als einziger auch synthetisch dargestellt worden (KARRER & WIDMER 1920; ROBERTSON & SANDROCK 1933). Erstere geben als Schmelzpunkt des synthetischen Produktes  $140^\circ$ — $141^\circ$  an, während Robertson & Sandrock den Wert  $143^\circ$  gefunden haben. Bei der Schmelzpunktbestimmung einer natürlichen Aspidiuolprobe, die Karrer von Boehm erhalten hatte, ergaben sich Werte zwischen  $145^\circ$  und  $156^\circ$ .

*Mikrochemie.* Das Aspidinol löst sich auf dem Objektträger bei Zusatz von Alkohol ohne Erhitzung und kristallisiert erst nach Verflüchtigung des Lösungsmittels als kristallinische Masse am Deckglasrand aus. Bei Zugabe von Semikarbazidreagens (2 g Semikarbazidhydrochlorid + 18 g 5 % Ammoniak) zu einer Ammoniaklösung von Aspidinol bildeten sich nach 10—15 Minuten charakteristische Nadelbüschel (Abb. 23). Jede entsprechende Behandlung der übrigen untersuchten Filixstoffe auf dem Objektträger fiel negativ aus. Die Reaktion war also für das Aspidinol spezifisch.

Bei der Mikroschmelzpunktbestimmung konnte beobachtet werden, dass die Aspidinolnadeln von etwa  $120^\circ$  an in eine andere Kristallform, charakteristische quadratische bis rektanguläre Tafeln bzw. Stäbchen (Abb. 24), übergingen. Die Substanz schmolz bei  $152^\circ$ , und die Schmelze erstarrte nach der Abkühlung wieder kristallinisch zu konzentrisch angeordneten Kristallschuppen (Abb. 25). Diese repräsentierten augenscheinlich eine neue Kristallform, denn die Schmelzpunktbestimmung ergab jedesmal einen genau vier Grade niedrigeren Wert als den ursprünglichen, d. h.  $148^\circ$ .

Nach den neuesten Untersuchungen von KOFLER (1934) hat es sich erwiesen, dass eine überraschend grosse Anzahl von organischen Stoffen in verschiedenen polymorphen Modifikationen mit abweichender Kristallform und divergierendem Schmelzpunkt auftritt. Diese sind früher übersehen worden, weil nach Kofler die verschiedenen Formen bei der Makroschmelzpunktbestimmung durch die gegenseitige Berührung der Kristalle bei der Erhitzung stets in ein und dieselbe Kristallform übergehen. Besonders durch Sublimation eines Stoffes lassen sich jedoch seine verschiedenen Modifikationen im Sublimat gewinnen, wo der Mikroschmelzpunkt der einzelnen Formen bestimmt werden kann, weil die Kristalle hier licht verteilt liegen und einander nicht durch gegenseitige Berührung beeinflussen können.

*Mikrosublimation.* Das Aspidinol sublimiert ohne Zerfall weit unter seinem Schmelzpunkt, von  $100^{\circ}$  an, unter Bildung von kristallinischen Sublimaten verschiedenem Aussehen (Abb. 26 und 27). Nach dem Schmelzen erhält man meistens amorphe Sublimate mit vereinzelten Kristalltäfelchen.

Bei Zugabe von Alkohol zu den Sublimaten bildete sich nach Verdunsten des Alkohols eine starre Kristallmasse (Abb. 28), bei Zusatz von Äther und Verdunsten desselben ineinander geschlungene Fäden. Ein Versuch mit dem oben erwähnten Semikarbazidreagens ergab die eben beschriebenen Kristallformen (Abb. 29). Bei der Mikroschmelzpunktbestimmung der Sublimatkristalle bildeten sich bei erreichten  $120^{\circ}$  die oben beschriebenen quadratischen Kristalle, die dann bei  $143^{\circ}$ — $152^{\circ}$  wieder schmolzen.

### 6. Phloraspin.

Dieses Phlorogluzinderivat ist in den meisten organischen Lösungsmitteln nur schwer löslich, löst sich aber in Azeton und Chloroform. Ferrichloridlösung färbt die Lösung braunrot.

Schmelzpunkt  $211^{\circ}$ . Strukturformel nirgends angegeben, BOEHM (1903 d) nennt die Bruttoformel  $C_{23}H_{23}O_8$ .

*Mikrochemie.* Als für das Phloraspin kennzeichnend wurde beobachtet, dass es beim Erhitzen bis zur Schmelze zerfiel, so dass ein blutrot gefärbtes Produkt gebildet wurde. War die Substanz nicht ganz rein, so trat die Rotfärbung schon bedeutend unterhalb des Schmelzpunktes ein.

*Mikrosublimation.* Bei Normaldruck nach dem Schmelzen nur Spuren von Sublimatbildung, und auch im Vakuum fiel das Resultat nicht besser aus. Dies mag im ersten Augenblick seltsam erscheinen, lässt sich aber vermutlich auf die Weise erklären, dass der hohe Schmelzpunkt eine so starke Erhitzung fordert, dass es dabei zu einem weitgehenderen Zerfall als bei den anderen untersuchten Stoffen kommt.

**C. Versuch zum Nachweis der in den entsprechenden Drogen natürlich vorkommende Phlorogluzinderivate durch Mikrosublimation.**

Diese Versuche sind ausgeführt worden, um Verfahren zum mikrochemischen Nachweis der im vorhergehenden beschriebenen natürlichen Phlorogluzinderivate in ihren Mutterpflanzen ausfindig zu machen. Bisher sind nämlich einschlägige Angaben in der Literatur äusserst spärlich vorhanden.

ROSENDALH (1911) hat in einem Vortrag in der Schwedischen Ärztegesellschaft bezüglich des Nachweises verschiedener Phlorogluzinderivate im Ätherextrakt von *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* gewisse Angaben gemacht, die vom Standpunkt des Vorliegenden Interesse beanspruchen. Über das Extrakt der erstgenannten Art sagt er, dass es nach der Beseitigung des Äthers teils kleine nadelförmige, freiliegende Kristalle, teils farblose und graugelbe, runde Kristallanhäufungen von verschiedener Grösse (Albaspidin und Flavaspidsäure) ausscheidet; bei *D. austriaca*-Extrakt wiederum bilden sich nach Rosendahl nach Verflüchtigung des Äthers teils kleine nadelförmige Kristalle, teils bis 3 cm lange, rechteckige, dünne und freiliegende oder zu Bündeln zusammengefasste Kristallblättchen. (Aspidinin.) Die Art der Identifizierung dieser im Extrakt auftretenden Kristalle wird vom Autor nicht angegeben, aber der Umstand, dass das Aspidin nicht genannt wird, wirkt einigermassen befremdend, da es ja als das in den genannten Extrakten am reichlichsten vorkommende von allen Phlorogluzinderivaten mit grösster Wahrscheinlichkeit unter den auskristallisierten Substanzen zu finden sein müsste. — Rosendahl macht diese Angaben als vorläufige Mitteilung über eine grössere Untersuchung, von der jedoch später nichts veröffentlicht worden sein dürfte.

Das gleiche Thema hat KARMA (1938 a) in seiner Arbeit »Rhizoma filicis-rohdoksen mikrohärmeistä« behandelt. Es werden die Mikrosublimate folgender Farnarten beschrieben: *Dryopteris filix mas*, *D. spinulosa*, *D. austriaca*, *Athyrium filix femina*, *Pteris aquilina* und *Onoclea struthiopteris*. Die drei erstgenannten Arten ergaben reich ausgebildete kristallinische Mikrosublimate, wobei beobachtet werden konnte, dass sich das Mikrosublimat von *Dryopteris filix mas* wesentlich von dem der beiden anderen *Dryopteris*-Arten unterschied, die sich hinwieder in dieser Beziehung weitgehend glichen. Auf Grund der Schmelzpunktbestimmung der Sublimatkristalle nahm Karma an, dass diese bei *D. filix mas* aus Aspidinol, bei den beiden anderen Arten möglicherweise aus irgendeinem Spaltungsprodukt des Aspidins gebildet waren. Da die reinen Phlorogluzinderivate dem Autor nicht zugänglich waren, konnte er nicht die Richtigkeit dieser Vermutungen an Hand kontrollierender Sublimationsversuche nachprüfen.

Auf Grund meiner im vorhergehenden beschriebenen Sublimationsversuche war nun zu erwarten, dass es möglich sein würde, nach diesem Verfahren Alb-

aspidin und Aspidinol durch Sublimation unter Normaldruck in Farrrhizomen mit einem Gehalt an diesen Stoffen sowie Filixsäure als Albaspidin in filixsäurehaltigen Rhizomen nachzuweisen. Und bei Heranziehung der Vakuumsublimation war ferner anzunehmen, dass Aspidin und Flavaspidsäure in die Sublimate solcher Arten, die einen Gehalt an diesen Substanzen aufweisen, übergehen würden und so ebenfalls zu ermitteln wären.

Folgende einheimischen Farnarten, die nach der einschlägigen Literatur verschiedene Phlorogluzinderivate enthalten, wurden in diesem Sinne einer Prüfung unterzogen: *Dryopteris spinulosa*, *D. austriaca*, *D. filix mas*, *D. cristata* und *Athyrium filix femina*.

### 1. *Dryopteris spinulosa*.

Die Droge enthält, wie aus dem Obigen hervorgeht, Aspidin, Albaspidin, Flavaspidsäure, Aspidinol und Phloraspin.

Der Untersuchung liegen folgende Proben der Droge zugrunde:

1. Pernå, 6. VII. 1938; nach einjähriger Aufbewahrung untersucht. —
2. Helsingfors, Degerö, 2. X. 1938; ebenso. — 3. Helsingfors, Munksnäs, 25. V. 1941; frisch und nach einjähriger Aufbewahrung untersucht. — 4. Pernå, 4. VI. 1942; frisch untersucht. — 5. Munksnäs, 30. V. 1942; ebenso.

Sowohl die getrockneten als die in frischem Zustand untersuchten Proben ergaben bei der *Sublimation* ähnliche kristallinische Sublimate. Diese wurden von 150° an gebildet, und ihre Form wechselte von kurzen, geraden Nadeln bis zu ineinandergeschlungenen fadenförmigen Gebilden bzw. breiteren Bändern (Abb. 30—32). In bezug auf den Formenreichtum wie auch auf das Aussehen im übrigen bestand eine unverkennbare Übereinstimmung mit den entsprechenden Abbildungen bei KARMA (1938 a).

Bei etwa 200° bildeten sich gelbe, alsbald kristallinisch erstarrende Tropfen (Abb. 33).

Betrachtet man die Sublimatbilder der Droge und vergleicht sie mit den entsprechenden Bildern für Aspidinol und Albaspidin, so erlauben sich keine sicheren Schlüsse über das Vorkommen bzw. Fehlen der beiden genannten Stoffe in den Sublimenten.

Bei Zugabe von Alkohol lösten sich die Kristalle augenblicklich, abgesehen jedoch von den bei 200° gebildeten, die sich anscheinend teilweise lösten und zerbarsten und einen undeutlichen kristallinischen Niederschlag hinterliessen, für den nach Waschen mit Alkohol der Schmelzpunktswert 147° gemessen wurde. Bei Abkühlung erstarrte die Schmelze wieder kristallinisch, was ganz offensichtlich auf *Albaspidin* hinwies. Deutlich ausgebildete Albaspidinkristalle konnten nur schwer gewonnen werden. Auch nach der Resublimation ging es nicht besser; da sich aber das Albaspidin, wie gleich zu zeigen sein wird,

mit Leichtigkeit im Vakuumsublimat feststellen liess, wurden keine weiteren Versuche zu dessen Nachweis in den Sublimaten unter Normaldruck vorgenommen.

Die bei niedriger Temperatur erzielten Sublimate ergaben bei der Resublimation bei 100° ineinandergeschlungene, fadenförmige Kristalle, die bei der Schmelzpunktbestimmung bei etwa 100°—120° sublimierten oder schmolzen; ein genauer Schmelzpunkt konnte für sie nicht ermittelt werden. In besonders kristallreichen Resublimaten erhielt man bei der für die Schmelzpunktbestimmung vorgenommenen Erhitzung von 120° ab deutliche *Aspidinolkristalle*, für die als höchster Schmelzpunktswert 140° gemessen wurde (Abb. 34). Der richtige Schmelzpunkt des Aspidinols war also nicht aufzufinden, die Identität des Stoffes konnte aber weiterhin durch Zusatz von Semikarbazidreagens bestätigt werden, wobei sich nach etwa 15 Minuten zarte Nadelbüschel am Deckglasrand bildeten (Abb. 35).

Bei der *Vakuumsublimation* (etwa 10 mm Vakuum) trat Sublimatbildung von 150° an ein. Die tropfigen Sublimate zeigten auch nach eintägigem Stehen nicht die bei Normaldruck erhaltenen Sublimatbilder. Bei Zusatz von Alkohol bildeten sich alsbald dem blosen Auge sichtbare weisse Flecken, die sich bei mikroskopischer Betrachtung als Anhäufungen von kleinen scharfen Nadeln oder Drusen erwiesen (Abb. 36). Diese ergaben nach Waschen mit Alkohol den Schmelzpunktswert 149°. Der Schmelzpunkt und die Kristallform stimmten also mit denen bei *Albaspidin* überein; eine weitere Bestätigung ergab sich dadurch, dass die Schmelze nach der Abkühlung wieder kristallinisch erstarrte.

Ausser diesen bei Alkoholzusatz entstandenen Albaspidinkristallen bildeten sich in den Vakuumsublimaten bei Zugabe von Alkohol nach etwa 30 Minuten schön entwickelte grosse Kristalldrüsen (Abb. 37), die nach Waschen mit Alkohol den Schmelzpunkt des *Aspidins*, 124°, aufwiesen. Diese Aspidinkristalle sind nicht in jeder Hinsicht denjenigen gleich, die bei der Vakuumsublimation von Aspidin erhalten wurden, das abweichende Aussehen kann aber dadurch erklärt werden, dass sie bei langsamem Auskristallisieren in verdünnter Lösung und nicht augenblicklich, wie in den reinen Aspidinsublimaten, entstanden waren.

Flavaspidsäure konnte in diesen Vakuumsublimaten trotz wiederholter Versuche nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise wirken die übrigen Bestandteile der Droge dahin, dass die Flavaspidsäure bei der Erhitzung zerfällt. Das Aspidinol war dadurch eigentlich, dass es sich bei Sublimation unter Normaldruck viel leichter als bei Vakuumsublimation feststellen liess.

Die Sublimationsversuche mit *Dryopteris spinulosa* geben also zu erkennen, dass das Aspidinol durch Sublimation unter Normaldruck sowie durch Zusatz

von Semikarbazidreagens oder Erhitzung der bei 100° erhaltenen Resublimate auf 130° nachgewiesen werden kann. Aspidin wie auch Albaspidin ergeben sich durch Behandlung der Vakuumsublimate mit Alkohol.

In den meisten Proben liess sich das Aspidin auf die oben angeführte Art nachweisen. Noch sichrere Resultate lieferte das folgende Verfahren.

Etwa 5 g der getrockneten oder 20 g der frischen Droe wurden nach dem Verfahren auf S. 17 unter zeitweiligem Umrühren mit 2 g MgO und 500 g Leitungswasser behandelt und über Nacht stehengelassen. Dann wurde abfiltriert und dem klaren, roten Filtrat verdünnte Salzsäure zugetropft, bis saure Reaktion eintrat. Den dabei entstandenen voluminösen, fleischfarbenen Niederschlag liess man zu Boden sinken, wonach er durch ein kleines Filter abfiltriert und mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Nach Trocknung bei gewöhnlicher Zimmertemperatur wurde der Niederschlag mit Hilfe einer Rasierklinge vom Filter abgekratzt und unter verminderter Druck (etwa 10 mm) bei etwa 160° sublimiert. Bei Zugabe von Alkohol bildeten sich in den Sublimaten fast unmittelbar reichliche Aspidinkristalle (Abb. 38) und dicht zusammengehäufte kleine Kristalle von Albaspidin, die sich nach Waschen mit Alkohol mit Hilfe des Schmelzpunktes identifizieren liessen. Die Aspidinkristalle hatten hierbei, in konzentrierter Lösung rasch auskristallisiert, ein etwas anderes Aussehen als die oben beschriebenen, bei direkter Vakuumsublimation des Drogenpulvers gewonnenen Kristalle.

Aspidin und Albaspidin konnten nach dem obigen Verfahren auch ohne Mikrosublimation nachgewiesen werden, wobei der mit Salzsäure entstandene Niederschlag nach der Trocknung mit Äther durchgeschüttelt wurde. Nach Verdunsten des Äthers wurde der Rückstand mit etwas Alkohol verrieben. In dem dabei gebildeten Niederschlag waren sowohl Aspidin als Albaspidin mikroskopisch nachweisbar, ersteres in aspidinreichen Drogen schon in Trockenproben von 2 g.

## 2. *Dryopteris austriaca*.

Die Droe enthält, wie früher bereits dargestellt wurde, Aspidin, Albaspidin, Aspidinin, Flavaspidsäure, Aspidinol und Phloraspin.

Die Versuche wurden mit folgendem Material ausgeführt:

1. Über 20 Jahre alte Proben des Pharmazeutischen Instituts. — 2. Munksnäs, 11. VI. 1938; untersucht nach einjähriger Aufbewahrung. —
3. Pernå, 15. VII. 1938; ebenso. — 4. Ebendorf, 5.VIII.1938; frisch und nach zweijähriger Aufbewahrung untersucht. — 5. St. Johannes (Karelische Landenge), 8. X. 1941; untersucht nach einjähriger Aufbewahrung. — 6. Mölandet, im Nylandischen Schärenhof, 14. VI. 1942; frisch untersucht. —
7. Pernå, 4. VI. 1942; ebenso.

Bei *Sublimation unter Normaldruck* ergaben sich mit *Dryopteris spinulosa* völlig übereinstimmende Sublimatbilder (Abb. 39—41). Nachweis von *Aspidinol* wie dort mittels Semikarbazid oder Erhitzung der Resublimate auf 130° (Abb. 42 und 43).

Auch die *Vakuumsublimate* fielen wie bei *D. spinulosa* aus. *Aspidin* und *Albaspidin* waren mit Hilfe des oben beschriebenen Verfahrens leicht nachweisbar (Abb. 44—46).

*Aspidin* liess sich ausser in den frischen auch in den ein- und zweijährigen Proben, nicht aber in den alten Proben des Pharmazeutischen Instituts feststellen. *Albaspidin* und *Aspidinol* ergaben sich in sämtlichen Proben. *Flavaspidsäure* konnte trotz wiederholten Versuchen auch bei dieser Art nicht in den Vakuumsublimate nachgewiesen werden. Auch für das *Aspidinol* gilt dasselbe wie oben bei *D. spinulosa*, indem es nur ausnahmsweise in den Vakuumsublimate zu finden war.

### 3. *Dryopteris filix mas.*

Die Droge enthält, wie bereits angegeben, *Filixsäure*, *Albaspidin*, *Flavaspidsäure*, *Aspidinol* und *Phloraspin*.

Folgende Proben wurden untersucht:

1. Über 20 Jahre alte Proben des Pharmazeutischen Instituts. — 2. Eine 8 Jahre alte Probe aus Lahtis. — 3. Mölandet, 23. V. 1942; frisch untersucht. — 4. Munksnäs, 2. VI. 1941; frisch und nach einjähriger Aufbewahrung untersucht.

Die frischen und die einjährigen Proben lieferten bei der *Sublimation unter Normaldruck* nur spärliche Kristalle in Form von geraden Nadeln, die beiden erstgenannten alten Proben hingegen ergaben reichentwickelte kristallische Sublimate, die aber nicht den gleichen Formenreichtum wie die der beiden vorhergehenden *Dryopteris*-Arten aufwiesen, sondern nur aus geraden, teilweise zusammengeflossenen Nadeln bestanden (Abb. 47 und 48).

Bei ugf. 200° bildeten sich gelbe Tropfen, die kristallinisch zu dickeren Kristallgebilden erstarren.

Bei Zugabe von Alkohol lösten sich die Kristalle sogleich ausser den bei höherer Temperatur gewonnenen, die sich wie die entsprechenden Kristalle bei *D. spinulosa* verhielten und also augenscheinlich aus *Albaspidin* bestanden.

Die bei niedrigerer Temperatur erhaltenen Sublimate wurden bei 100° resublimiert unter Bildung von geraden Kristallnadeln, die bei der Schmelzpunktbestimmung bei 130°—140° sublimierten oder schmolzen. Der höchste gemessene Schmelzpunktswert war 143°. Bei ugf. 120° gingen die Kristalle in die für *Aspidinol* kennzeichnende Tafelform über (Abb. 49).

Mit Semikarbazid bei Sublimaten und Resublimaten positive Reaktion auf *Aspidinol* (Abb. 50).

Bei *Vakuumsublimation* bildeten sich bei 160° tropfige Sublimate, die mit Alkohol *Albaspidinkristalle* lieferten (Abb. 51). Schmelzpunkt 148°. Diese Kristalle waren am leichtesten aus den alten Proben zu gewinnen, wurden aber, obwohl spärlich, auch in den frischen Proben bei Zusatz von Alkohol gebildet. Flavaspidsäure war nach wie vor nicht nachweisbar, vom Aspidinol gilt dasselbe wie bei den vorhergehenden Arten.

Wie aus den Untersuchungen hervorgegangen sein dürfte, bestehen die Kristalle der unter Normaldruck erhaltenen Sublimate sowohl von *Dryopteris filix mas* als von *D. spinulosa* und *D. austriaca* aus Aspidinol, in bei höherer Temperatur gewonnenen Sublimaten mit Beimischung von Albaspidin. Dieser Umstand erscheint recht bedeutsam, wenn man sich vergegenwärtigt, dass die Sublimatbilder von *D. filix mas* und den beiden zuletzt genannten *Dryopteris*-Arten so stark voneinander abweichen, dass sie sich, wie KARMA (1938 a) bereits gezeigt hat, als Hilfsmittel bei der Trennung der *Filix mas*-Droge von den beiden anderen Arten verwenden lassen. Reich entwickelte kristallinische Sublimate wurden bei *D. spinulosa* und *D. austriaca* sowohl aus frischem wie aus altem Drogenpulver erhalten, während dies bei *D. filix mas* augenscheinlich nur bei älteren Proben der Fall ist.

#### 4. *Dryopteris cristata*.

Diese Art enthält nach MAIZITE (1938, 1942) Albaspidin und Flavaspidsäure, doch ist auch das Vorkommen von anderen Phlorogluzinderivaten anzunehmen.

Das Material: Eine am 23. V. 1942 in Pernå eingesammelte Probe, frisch und in getrocknetem Zustand untersucht.

*Sublimation unter Normaldruck* ergab reich entwickelte kristallinische Sublimate, die in bezug auf ihren Formenreichtum an diejenigen von *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* erinnerten (Abb. 52 und 53). Bei Zusatz von Alkohol lösten sich die Kristalle. Semikarbazid ergab die für *Aspidinol* kennzeichnenden Kristallbilder (Abb. 54). Bei der Resublimation bei 100° bildeten sich Kristalle, die beim Erhitzen auf 120° im Schmelzpunktapparat in Aspidinoltafeln übergingen (Abb. 55). *D. cristata* enthält somit auch Aspidinol, was bisher in der Literatur nicht angegeben ist.

*Vakuumsublimation* ergab auch hier tropfige Sublimate, die bei Zusatz von Alkohol *Albaspidinkristalle* ausschieden (Abb. 56). Schmelzpunkt 148°.

5. *Athyrium filix femina.*

Nach HAUSMANN (1899) enthält das Rhizomextrakt von *Athyrium filix femina* Filixsäure (2 %) und Flavaspidsäure (1.8 %). Wie jedoch aus dem Nachstehenden hervorgeht, muss diese Angabe bezweifelt werden.

Das Untersuchungsmaterial:

1. Drei Jahre alte Probe aus Pernå (eingesammelt i. J. 1938). — 2. Pernå, 15. VI. 1942; frisch und in getrocknetem Zustand untersucht.

Diese Proben ergaben bei *Sublimation unter Normaldruck* nur amorphe Sublimate, in denen sich bei Zusatz von Alkohol oder Semikarbazidreagens keine Kristalle bildeten.

Die *Vakuumsublimate* waren gleichfalls amorph oder tropfig. Bei Zugabe von Alkohol konnten keine Kristalle beobachtet werden, die auf das Vorkommen von Albaspidin oder Flavaspidsäure in den Sublimaten hingedeutet hätten.

Die Mikrosublimation lieferte also keine Anhaltspunkte für den Nachweis von Phlorogluzinderivaten in der *Athyrium filix femina*-Droge. Dieser Befund steht in vollem Einklang mit dem vorher angegebenen und von älteren Autoren hervorgehobenen Fehlen innerer sekretführender Haare bei der Droge. Gegenüber diesen Tatsachen muss die Angabe von Hausmann über das Vorkommen von Filix- und Flavaspidsäure in der Droge mindestens als zweifelhaft betrachtet werden. Damit dieses Vorkommen möglich sei, müsste man annehmen, dass die Phlorogluzinderivate nicht in die inneren Sekrethaare, sondern anderswohin im Zellgewebe verlegt seien. Es dünkt jedoch unwahrscheinlich, dass sie bei dieser Art anders angebracht wären als bei den anderen untersuchten Arten.

## VI. Physiologische Wirkung der natürlichen Farnbestandteile.

### A. Frühere Untersuchungen über die Wirkung der Filixdroge.

Die Frage, durch welchen bzw. durch welche Stoffe die Wirkung der anhelmintischen Farnrhizome bedingt wird, ist seit geraumer Zeit lebhaft diskutiert worden, ohne dass in derselben heute schon endgültige Klarheit erlangt wäre. Im Gegenteil darf man wohl sagen, dass *Rhizoma Filicis* nach wie vor zu den Pflanzendrogen unserer Pharmakopöe gehört, die in bezug auf ihre wirksamen Substanzen und deren Zusammensetzung in den Rhizomen vorläufig noch als relativ unklar gelten müssen.

Es herrscht aber schon seit langem die Ansicht, dass das wirksame Prinzip der Droge in den in ihr enthaltenen Phlorogluzinderivaten, d. h. in denjenigen sauren Bestandteilen zu suchen ist, die einen wichtigen Teil des sog.

Rohfilizins bilden. Wie aus der obigen Darstellung ersichtlich geworden ist, ist eine Mehrzahl dieser Stoffe bekannt und beschrieben. Geht man also davon aus, dass eben diese Phlorogluzinderivate die wirksamen Bestandteile der Droge ausmachen, so folgt daraus, dass Unterschiede sowohl im quantitativen als im qualitativen Gehalt der Droge an diesen Stoffen unbedingt auch entsprechende Unterschiede in der Wirkung der Droge herbeiführen müssen. Das Problem von der Wirkung der Filixdroge hat sich auch als hochgradig verwickelt erwiesen, und in der Literatur sind einander widersprechende Behauptungen und Ansichten nicht schwer zu finden.

Wie bereits in der Einleitung hervorgehoben wurde, war man früher der Ansicht, dass im Herbst eingesammelte Wurzelstücke das wirksamste Extrakt lieferten — eine Auffassung, der man in pharmakognostischen Handbüchern auch heute noch begegnet und die sogar noch in manchen neuesten Pharmakopöen, wie in der schweizerischen, deutschen und schwedischen, wiederkehrt, trotzdem durch neuere Untersuchungen (KOFLER & MÜLLER 1930; STAMM 1932; CARLSSON & BÄCKSTRÖM 1942; MAIZITE 1942) im Gegenteil erwiesen sein dürfte, dass vielmehr die Sommerdroge die grösste Wirkungskraft besitzt.

Die eingehendsten Untersuchungen über dieses Thema sind von MAIZITE ausgeführt worden, der die Resultate seiner Forschungen etwa folgendermassen zusammenfasst. Sämtliche antihelmintisch wirkenden Farmrhizome liefern das ganze Jahr hindurch eine reichliche Extraktausbeute mit hohem Rohfilizin- bzw. Rohaspidingeinhalt und guter Wirkung. Am grössten ist jedoch die Ausbeute in den Sommermonaten Juni und Juli, und in Übereinstimmung damit erreicht auch der Rohfilizin- bzw. Rohaspidingeinhalt seinen höchsten Wert, was aber nicht zugleich auch eine erhöhte Wirkung zu bedeuten braucht. Die offizinelle *Filix mas*-Droge ist noch im September effektiv.

Auch dem Standort ist früher eine bestimmte Rolle hinsichtlich der Effektivität der Droge zugeteilt worden, indem den Gebirgsdrogen eine grösse Wirkung zugesprochen wurde als solchen Drogen, die im Tiefland eingesammelt waren. Auch diese Auffassung hat bei späteren Untersuchungen keine Stütze gefunden.

Was den Einfluss der Aufbewahrung auf die Wirkung der Droge betrifft, haben die physiologischen Versuche von WASICKY (1923, 1924), STAMM (1934), MAIZITE (1942) u. a. gezeigt, dass den Rhizomen im Frischzustand optimale Wirkung zukommt, die bei der Trocknung und Aufbewahrung bedeutend abnimmt.

Da es sich aber bei den Bestandteilen der Filixdroge um hocheffektive Stoffe handelt, die, in grösseren Dosen verabreicht, schädlich auf den menschlichen Organismus einwirken können, wie die Literatur vielfach zu berichten weiss, und unter Umständen sogar den Tod herbeizuführen vermögen — auch aus unserem Lande sind Todesfälle bei Wurmkuuren gemeldet worden —,

hat sich ein dringendes Bedürfnis nach einer Wertbestimmung der Droge geltend gemacht.

1. Das älteste Bestimmungsverfahren, die *Pharmakopöemethode*, leitet sich von FROMME her (nach TSCHIRCH 1923) und ist in modifizierter Form in die meisten Pharmakopöen aufgenommen. Es baut auf dem Umstand, dass die Phlorogluzinderivate saure Phenolhydroxylgruppen enthalten, die mit Alkalien unter Bildung von Salzen reagieren. Aus der alkalischen Lösung werden die Phlorogluzinderivate erneut mit Säure ausgefällt, mittels Äther aus der Wasserlösung extrahiert und nach Beseitigung des Äthers als Rohfilizin gewogen, das das Stärkemass der Droge angibt. Die sechste Auflage der finnischen Pharmakopöe schreibt folgendes Bestimmungsverfahren für *Extractum filicis* vor: »5.0 g Extrakt werden in 30.0 g Äther gelöst und die Lösung einige Minuten lang mit 100 ml Bariumhydroxydlösung (3 + 97) im Scheide-trichter geschüttelt. In 82.0 g (= 4 g des Farmrhizomextraktes) der geklärten und separierten Wasserlösung werden 3 g Chlorwasserstoffsäure zugesetzt und die Mischung dreimal mit je 20 g Äther durchgeschüttelt. Die Ätherlösung wird in einen tarierten Messkolben filtriert und der Äther abdestilliert; der Rückstand muss nach Trocknung bei 100°—102° 1.0—1.12 g wiegen.»

Nach den Kommentaren zu der neuesten Auflage der deutschen Pharmakopöe ist die Bestimmung des Rohfilizingehalts in dieselbe aufgenommen worden, um ein Mittel zur Ausscheidung wirklich minderwertiger Droge oder zum Schutz der Droge vor fremden Beimischungen in der Hand zu haben; ausdrücklich wird aber darauf hingewiesen, dass das Verfahren kein Mass für die tenizide Wirkung der Droge liefert. Dass es aber in der Praxis dennoch dazu gekommen ist, kann man aus sämtlichen pharmakognostischen Handbüchern ersehen. An dieser Auffassung, nach der der Rohfilizingehalt als Stärkemass der Droge gelten soll, ist mit Recht scharfe Kritik geübt worden.

Die Rohfilizinbestimmung bietet jedoch, wenn sie auch den ungefähren Wert des stark variiierenden Gehaltes an Phlorogluzinderivaten andeutet, kein Mass für die tatsächliche tenizide Wirkung der Droge, da sie sich auf die Summe sämtlicher sauren, ätherlöslichen Bestandteile, also sowohl der wirksamen als der unwirksamen, bezieht. Diese Fehlerquelle hat man schon früher zu umgehen versucht, indem man eine Messung des *Filixsäuregehaltes* vorgeschlagen hat. Eine solche »Verbesserung« scheint indessen höchst zweifelhaft, da in Frage gestellt werden kann, ob die Filixsäure überhaupt als wirksamer als die anderen Bestandteile des Rohfilizins angesehen werden könne. Drittens werden die in der Droge enthaltenen Phlorogluzinderivate bei längerem Lagern offenbar in einfachere und wahrscheinlich auch weniger wirksame Spaltungsprodukte übergeführt, ohne dass damit eine entsprechende Abnahme des Totalgehaltes an Rohfilizin verbunden wäre. Die Pharmakopöe

warnt zwar vor längerer Aufbewahrung der Wurzelstücke, aber für das Extrakt findet sich keine entsprechende Vorschrift. Auch seine Wirkung nimmt jedoch mit der Zeit ab, wenngleich nicht in demselben Masse wie die der Droge; das ist durch die Untersuchungen von JARETZKY & PUNZEL (1938) und MAIZITE (1942) deutlich erwiesen worden.

2. Ein Bestimmungsverfahren, das sich gleichfalls auf den Phenolcharakter der Phlorogluzinderivate gründet, ist die von POPOFF (nach CARLSSON & BÄCKSTRÖM 1942) ausgearbeitete *kolorimetrische Wertbestimmungsmethode*, die in modifizierter Form von CARLSSON & BÄCKSTRÖM ausprobiert worden ist. Bei der Bestimmung werden die Phenole an mit  $\text{HNO}_2$  diazotierte Sulfanilsäure gekuppelt, wonach man den Extinktionskoeffizienten des intensiv gefärbten Kuppelungsprodukts im Kolorimeter bestimmt. Diesem Verfahren haftet offenbar der gleiche prinzipielle Fehler wie der Pharmakopöemethode an: Die Messung wird ohne Unterschied sämtliche an das Diazoniumsalz der Sulfanilsäure kuppelbaren Substanzen betreffen, einerlei ob sie wirksam sind oder nicht. Wie die Autoren gezeigt haben, ergeben sich nach diesem Verfahren einerseits für das *Filix mas*- und andererseits für das *Spinulosa*- bzw. *Austriaca*-Extrakt wesentlich verschiedene Werte, indem die Extinktionskoeffizienten beim ersten durchgehend höher liegen, und zwar, wie die Autoren angeben, darum, weil die Filixsäure, die den Hauptbestandteil des *Filix mas*-Extraktes ausmacht, einen bedeutend höheren Extinktionswert besitzt als das Aspidin, das wiederum in den *Spinulosa*- und *Austriaca*-Extrakten vorherrscht.

Bei einer Droge wie *Rhizoma Filicis*, bei der die wirksamen Substanzen aus einer Anzahl von Stoffen mit verschieden starker Wirkung aufgebaut sind und außerdem in verschiedenen und variierten Mengen auftreten, wird es jedoch wohl kaum möglich sein, durch eine chemische oder physikalische Wertbestimmung zu einer exakten Auffassung von der Stärke der Droge zu kommen. Darum ist man auch neuerdings bestrebt gewesen, diese Bestimmungsverfahren durch eine Wertbestimmung auf physiologischem oder pharmakologischem Wege zu ersetzen.

3. Das ideale Versuchsobjekt wären natürlich bei einer solchen *biologischen Wertbestimmungsmethode* der wurmabtreibenden Farmrhzome die pathogenen Eingeweidewürmer (die *Taenia*- oder *Bothriocephalus*-Arten) selbst; da diese aber aus leicht verständlichen Gründen schwer für derartige Versuche verfügbar sind, ist man gezwungen gewesen, sich nach anderen geeigneten Versuchstieren umzusehen. STRAUB (1902) bediente sich zu dem Zweck der Regenwürmer, in deren Segmente er verschieden stark verdünnte Lösungen des Farmextraktes injizierte. Später änderte YAGI (1914) das Verfahren dahin ab, dass er die Versuchstiere in eine mit  $\text{MgO}$  bereitete Extraktlösung legte und dann beobachtete, wie rasch die Würmer in derselben starben. WASICKY

(1923, 1924) experimentierte mit Kleinfischen nach der Methode von Yagi. Auf Straubs Vorschlag wurde bei einer Konferenz zur Standardisierung der Arzneimittel im Völkerbund im Jahre 1923 bestimmt, dass als Mass bei der physiologischen Wertbestimmung von *Filix mas*-Präparaten der gemeine Regenwurm, *Lumbricus terrestris*, verwendet werden sollte, und auf eine weiteren Sitzung in Genf im Jahre 1925 wurden auch Kleinfische (z. B. aus den Gattungen *Gobio*, *Carassius*, *Scardinius*) unter die zulässigen Versuchsobjekte aufgenommen. Später sind auch andere Versuchstiere, wie Blutegel und *Tubifex*-Würmer, zu den betreffenden Zwecken herangezogen worden. Auf der durch diese Untersuchungen geschaffenen Grundlage baut sich die biologische Wertbestimmungsmethode von WASICKY (1924) folgendermassen auf.

Man stellt aus dem *Filix*-extrakt eine Lösung der wirksamen Substanzen her, indem man 1 g des zu untersuchenden Extraktes mit so viel MgO verreibt, dass ein trockenes Pulver entsteht (bei der Untersuchung des Rhizoms wird also zunächst das Ätherextrakt zubereitet). Das Pulver wird in 20 ml destillierten Wassers kräftig durchgeschüttelt und 24 Stunden stehengelassen. Dabei lösen sich die Phlorogluzinderivate in Form von Magnesiumsalzen. Die Lösung wird filtriert, und aus dem Filtrat stellt man dann durch Verdünnung mit Wasser eine Reihe von Versuchslösungen in verschiedenen Konzentrationsabstufungen her. Von jeder Lösung kommen 100 ml in den Versuch, und zu einer jeden solchen Probe gibt man einen Fisch. Danach beobachtet man die Zeit, innerhalb deren die Fische in den Proben sterben. Als Titer gilt die Menge *Filix*-extrakt, die binnen einer halben Stunde tödlich auf das Versuchstier wirkt. Als Standard- oder Testsubstanz schlägt Wasicky ein kristallinisches, von KARRER synthetisiertes Phlorogluzinderivat, das Phlorbutyrophonen, vor, das in Verdünnung von 0.02—0.03 auf 100 die Versuchsfische binnen einer halben Stunde tötet. Dieses Verfahren ist später von verschiedenen Autoren, u.a. von MAIZITE (1942), modifiziert worden.

CARLSSON & BÄCKSTRÖM (1942) empfehlen als Testsubstanz das leichter zugängliche Hexylresorzin. Sie haben auch durch Versuche mit Regenwürmern zeigen können, dass die Kurve, die den Zusammenhang zwischen der relativen Hexylresorzindosis und dem Mortalitätsprozent der Versuchstiere angibt, im grossen gesehen den gleichen Verlauf wie beim System Farmextrakt/Regenwurm hat.

4. STAMM (1934) schlägt als Hilfsmittel für die Wertbestimmung der *Filix*-droge oder des Extraktes die Feststellung des Frischzustandes vor, und zwar von der Tatsache ausgehend, dass frische Drogen eine optimale Wirkung entwickelt. Er will einer derartigen Wertbestimmung sogar eine grössere Bedeutung beimessen als der biologischen. Wir möchten jedoch gegen eine solche Auffassung Einspruch erheben. Es ist nicht einzusehen, warum nicht

die biologische Methode imstande wäre, ein Mass für die Stärke der Droge abzugeben, keinesfalls tut es aber der »Frischzustand« der Droge, da frische Drogen in ihrer Wirkung bekanntlich weitgehend verschieden sein können.

5. Schliesslich wäre noch eine *hämolytische Wertbestimmungsmethode* denkbar. JODLBAUER (1932) hat die hämolytische Wirkung des Filixextraktes näher untersucht und gefunden, dass dieselbe, in grossen Zügen betrachtet, parallel mit der physiologischen verläuft, wie sie sich nach der biologischen Methode mit Regenwürmern ergibt. Er konstatiert aber, dass das Verfahren gegenüber der biologischen Wertbestimmungsmethode keine Vorteile zu bieten vermag.

Es ist äusserst anregend, sich in die vergleichenden Untersuchungen zu vertiefen, die zwischen der chemischen oder der Pharmakopöemethode einerseits und der biologischen Wertbestimmungsmethode andererseits ausgeführt worden sind. WASICKY (1923, 1924), der solche Parallelversuche zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen der Pharmakopöemethode und der biologischen Wertbestimmungsmethode angestellt hat, hat bei seinen Untersuchungen keine gemeinsamen Beziehungen zwischen den Resultaten der beiden Methoden finden können, im Gegenteil haben sich ganz beträchtliche Unterschiede ergeben. So haben sich z. B. Extrakte mit ungefähr gleich hohem Rohfilizingehalt in bezug auf ihre physiologische Wirkung als dermassen verschieden erweisen können, dass das eine Extrakt das andere um das Zehnfache an Stärke übertraf. Auch MAIZITES (1943) Untersuchungen weisen in die gleiche Richtung. *Der Rohfilizingehalt der Droge geht somit nicht parallel der physiologischen Wirkung, bestimmt nach der biologischen Methode.* Wasicky führte seine Versuche mit käuflichen Extrakten aus. Die bereits öfters erwähnten schwedischen Forscher CARLSSON & BÄCKSTRÖM (1942) bedienten sich bei ihren Untersuchungen der Wurzelstücke als Primärmaterial und stellten das nötige Extrakt selbst dar. Bei ihnen mit diesem einheitlichen Material nach der Pharmakopöemethode und der biologischen Wertbestimmungsmethode ausgeführten Parallelversuchen hat es sich nun herausgestellt, dass *dennnoch ein intimer Zusammenhang zwischen dem Rohfilizingehalt und der physiologischen Wirkung besteht.* Ihre Resultate stehen m. a. W. in scharfem Widerspruch zu Wasickys und Maizites Versuchen und werden von ihnen ausschliesslich auf den Umstand zurückgeführt, dass sie mit »bekannten« Extrakten arbeiteten, während sich die anderen Autoren einer in bezug auf ihre nähere Herstellungs- und Aufbewahrungsweise unbekannten Handelsware bedienten. Die Bestimmung des Rohfilizingehaltes als Wertbestimmung der Droge oder des daraus gewonnenen Extraktes erscheint also berechtigt, wenn die Droge garantiert frisch oder das Extrakt erst vor kurzem zubereitet ist, wogegen dieses Verfahren bei längerem Lagern der betreffenden Objekte immer unzuverlässiger wird. In der Praxis lassen sich

diese Bedingungen bei fabrikmässiger Herstellung des Filixextraktes kaum erfüllen. Jedenfalls ist die von Wasicky empfohlene biologische Wertbestimmungsmethode neben der Rohfilizinbestimmung im Hinblick auf die Vorbereitung einer neuen Auflage der Pharmakopöe dringend notwendig.

Da nun also alles darauf hindeutet, dass die wurmabtriebenden Eigenschaften der Farnrhizome den in denselben enthaltenen Phlorogluzinderivaten zuzuschreiben sind, gewährt die getrennte Untersuchung der physiologischen Wirkung der einzelnen aus den Wurzelstöcken isolierten Phlorogluzinderivate naturgemäss ein besonderes Interesse. Die Untersuchungen, die in diesem Sinne ausgeführt worden sind, sind vor allem darauf ausgegangen, die Giftwirkung zu ermitteln, die diese Stoffe auf verschiedene Versuchsobjekte ausüben.

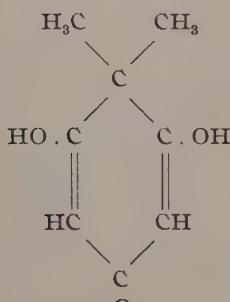
Die früher erwähnten Forscher der Jahrhundertwende, POULOSSON (1892, 1895, 1898) und BOEHM (1897), führten neben ihren bereits besprochenen Arbeiten auch vergleichende Untersuchungen über die physiologische Giftwirkung der von ihnen dargestellten Farnbestandteile aus. Pousson gibt an, dass er sich bei seinen Versuchen einer mit Natriumkarbonat bereiteten schwach alkalischen Lösung der Giftstoffe bediente, die er subkutan oder in das Blut seiner Versuchstiere injizierte. Er gibt die letale Dosis für die verschiedenen Filixstoffe bei Versuchen mit Fröschen zu 2 mg an; sie ist für sämtliche von ihm geprüften Stoffe, d. h. Filixsäure, Aspidin (Polystichin), Albaspidin (Polystichalbin), Aspidinin (Polystichinin) und Flavaspidsäure (Polystichozitrin), die gleiche.

Boehm kam bei seinen Versuchen zu Ergebnissen, die von denen Poussons nicht wenig abweichen. Er injizierte eine gleichfalls mit Natriumkarbonat bereitete Lösung von 1 auf 100 in den Lymphsack der Versuchstiere und erhielt so folgende Werte für die letale Dosis:

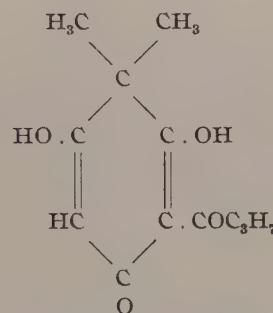
Aspidin .....	1—2 mg
Aspidinin .....	1—2 "
Albaspidin .....	4—5 "
Flavaspidsäure .....	10 "
Aspidinol keine Wirkung.	

STRAUB (1902) hat die von Boehm isolierten Farnbestandteile einem eingehenden Studium unterworfen, um den Zusammenhang zwischen ihrer physiologischen Wirkung und ihrer chemischen Konstitution zu ermitteln. Wie eingangs angedeutet, sind die kristallinischen Phlorogluzinderivate als Kondensationsprodukte von Buttersäure und verschiedenen Methylphlorogluzinen zu betrachten, und da die Buttersäure dabei ketonartig gebunden ist, können sie als Ketobutyrophlorogluzine oder Phlorogluzinbutanone aufgefasst werden. Das in allen genuinen Farnbestandteilen am häufigsten vorkommende Phlorogluzin ist die Filizinsäure.

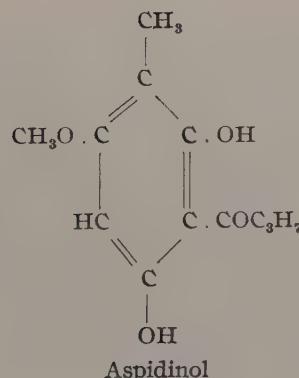
Diese obenerwähnten, bei alkalischer Abspaltung mit Zinkpulver entstehenden Spaltungsprodukte sind an und für sich physiologisch wirkungslos. Erst beim Zutritt eines Buttersäurerestes z. B. zum Filizinsäuremolekül, wobei Filizinsäurebutanon gebildet wird, gewinnt man eine Verbindung, bei der die die Filixstoffe kennzeichnende Giftwirkung angedeutet ist. Das natürlich vorkommende, mit dem Filizinsäurebutanon isomere Aspidinol ist schon unverkennbar wirksamer. Doch erst wenn das Molekül noch einen weiteren Phlorogluzinkern enthält, wie das z. B. bei Albaspidin und Flavaspidsäure der Fall ist, wo zwei Filizinsäurebutanone miteinander gekuppelt sind, kommt die antihelmintische Wirkung zu ihrer vollen Geltung, um nach Straub ihren Höhepunkt bei der Filixsäure mit deren drei Phlorogluzinkernen im Molekül zu erreichen.



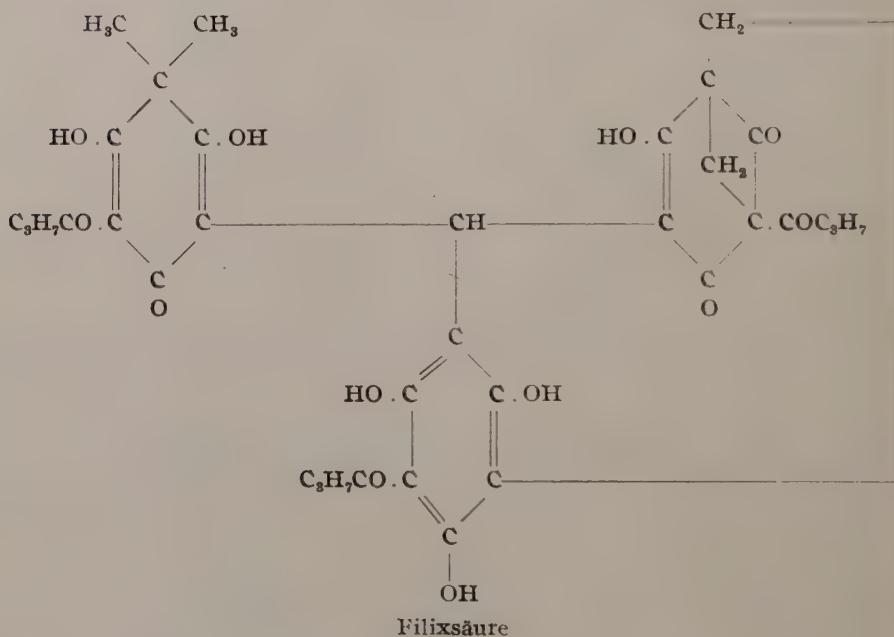
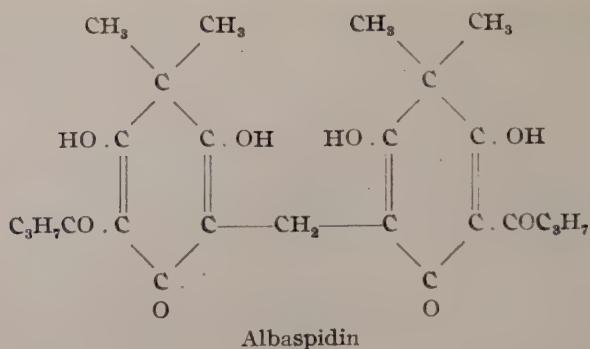
Filizinsäure



Filizinsäurebutanon



Aspidinol



Auf dieses Schema hat STRAUB seine bekannte These begründet, dass die physiologische Wirkung der Farnbestandteile mit der Zahl der im Molekül enthaltenen Phlorogluzinkerne steigt. Diese Auffassung scheint sich in vielen pharmakognostischen Handbüchern zu wiederholen und ist anscheinend von KRAFT (1904) vertreten worden, der im Filmaron den weitaus effektivsten von allen natürlich vorkommenden Filixstoffen gefunden zu haben glaubte und es als eine bestimmte chemische Verbindung mit vier Phlorogluzinkernen im Molekül deutete. Die Darstellungsweise des Stoffes wird von Kraft nirgends angegeben, nach der chromatographischen Arbeit von FICHTER (1938) dürfte er aber heute als eine Mischung verschiedener Stoffe aufgefasst werden.

Zu seiner eben genannten These kam Straub beim Studium der physiologischen Wirkung der untersuchten Farngifte auf freipräparierte Froschmuskeln. Auf Grund dieser Versuche gibt nun Straub die Ordnungsfolge der Farinstoffe nach steigender Toxizität, wie folgt:

Sämtliche Phlorogluzine, Filizinsäure, Buttersäure: keine Wirkung, wirksam: Filizinsäurebutanon < Aspidinol < Flavaspidsäure < Albaspidin < Filixsäure.

Diese Reihenfolge findet man aber nicht in Straubs anderweitigen Versuchen wieder. In HEFFTERS Handbuch der Pharmakologie (1920) gibt Straub die letale Froschdosis auf Grund eigener und früherer Untersuchungen (BOEHM, POULSSON) gemäss nachstehender Aufstellung an:

Aspidin .....	1 mg
Aspidinin .....	2 "
Filixsäure .....	2 "
Albaspidin .....	4 "
Flavaspidsäure .....	10 "

In dieser Reihe finden wir z. B. das zwei Phlorogluzinkerne enthaltende Aspidin der »dreikernigen« Filixsäure vorangestellt.

YAGI (1914) erhielt bei seinen Regenwurmversuchen (siehe S. 45) folgende Werte für die letale Konzentration der von ihm untersuchten Farbstoffbestandteile:

Filixsäure .....	0.0009 %
Albaspidin .....	0.0005 %
Filmaron .....	0.0003 %

Ein besonderes Interesse beanspruchten GRÖNBERGS (1935) Versuche mit *Taenia* von der Katze und *Bothriocephalus latus* vom Hund. Die Versuche wurden so ausgeführt, dass man Stücke des Bandwurms in mit MgO bereitete Lösungen der Giftstoffe brachte. Versuchstemperatur 37°. Folgende Werte der letalen Grenzkonzentration wurden erzielt:

Filixsäure .....	0.006 %
Aspidin .....	0.008 %

Gegen STRAUBS These sprechen unzweideutig KARRERS (1919) interessante Versuche über die physiologische Wirkung synthetischer Phlorogluzinderivate. Es ergab sich nämlich, dass die Wirkung bei Zusammenkuppelung von Phlorogluzinkernen im Gegenteil abnahm, so dass die am einfachsten gebauten, mit nur einem Ring versehenen Phlorogluzinbutanone wirksamer als die mit zwei Ringen ausgerüsteten waren. Es ist jedoch zu bemerken, dass die von Karrer synthetisierten Phlorogluzinderivate hinsichtlich ihrer Struktur nicht mit den natürlichen identisch waren.

Unterzieht man die Giftwirkung der natürlichen Phlorogluzinderivate, wie sie uns in den oben besprochenen Untersuchungen entgegentritt, einer vergleichenden Betrachtung, so findet man, dass die Ergebnisse der verschiedenen Autoren unter sich erheblich variieren. Dieser Umstand dürfte wohl seine Erklärung in den jeweils weitgehend verschiedenen Versuchsbedingungen finden.

Bei meinen eigenen Versuchen wurde die biologische Wertbestimmungsmethode prinzipiell in ihrer oben (S. 46) nach WASICKY dargestellten Form befolgt.

## B. Eigene Untersuchungen.

### 1. Orientierende Versuche.

In den Sommern 1940, 1942 und 1943 wurden orientierende Versuche mit den von mir isolierten Farnbestandteilen durchgeführt, wobei ich deren Giftwirkung auf Würmer und Froschlarven studierte. Da die untersuchten Stoffe in ihrer Eigenschaft von freien Säuren wasserunlöslich sind, müssen sie in Salzform übergeführt werden, bevor die Versuchslösungen bereitet werden können. Dies erfolgte durch Darstellung teils ihrer Magnesiumsalze, teils der Ammoniumsalze. Die Stammlösungen wurden folgendermassen zubereitet.

1. 0.1 g der betreffenden Substanz wurde mit 3 g MgO und etwas Wasser im Mörser verrieben, das Gemisch in einen Messkolben von 1 l übergeführt und bis zur Marke mit Leitungswasser verdünnt. Danach liess man das Gemisch unter zeitweiligem Schütteln stehen und filtrerte nach 6 Stunden. Aus der so gewonnenen 0.01 %igen Stammlösung wurden danach die verschieden starken Versuchslösungen durch Verdünnung mit Leitungswasser bereitet.

2. 0.1 g des Stoffes wurde in einem Mörser in 5 ml 2.5 % NH<sub>3</sub> gelöst und darauf mit Leitungswasser bis etwa 500 ml verdünnt. Alsdann erfolgte die Neutralisation der erhaltenen Lösung durch Zutropfen von 5 % HCl (Lackmuspapier) und Verdünnung mit Leitungswasser bis 1 Liter. Bereitung der Versuchslösungen wie oben mittels abpipettierter Mengen der 0.01 %igen Stammlösung in Leitungswasser.

Wie aus dem Obigen hervorgeht, wurde bei der Bereitung der Stammlösungen nicht destilliertes, sondern gewöhnliches Wasserleitungswasser verwendet. Die Blindversuche erwiesen nämlich, dass die Versuchstiere im letzteren länger als im ersten am Leben blieben.

Für die Blindversuche kamen den obigen Stammlösungen entsprechende Lösungen, doch ohne Zusatz der Versuchsgifte und ohne nachträgliche Ver-

dünnung mit Wasser zur Anwendung. Die Versuchstiere hielten sich in diesen Blindversuchen mindestens einen Tag lang lebend. Eine Ausnahme bildete die mit MgO bereitete Stammlösung, in der die Würmer schon binnen etwa 15 Stunden starben (die Froschlarven lebten auch in dieser Lösung länger, über einen Tag). Für die Wurmversuche mit MgO bediente man sich daher beim Blindversuch einer mit ihrem eigenen Volumen Wasser verdünnten Lösung. In dieser Lösung lebten die Würmer ungefähr einen Tag.

Als Versuchsobjekte dienten teils Regenwürmer [*Allolobophora caliginosa* (Savigny) f. *typica*], deren Gewicht etwa 1 g betrug, teils Froschlarven (*Rana temporaria*). Alle Würmer waren am gleichen Ort in einem Park in Helsingfors und die Froschlarven in einem Graben ausserhalb der Stadt eingesammelt worden. Das Versuchsmaterial wurde stets noch am gleichen Tage angewandt.

Die Ausführung der Versuche erfolgte in der Weise, dass von der Stammlösung dem Obigen gemäss eine Reihe von Versuchslösungen in verschiedenen Konzentrationsabstufungen hergestellt wurde. Von jeder Versuchskonzentration wurden dann mehrere Proben zu 100 ml abgeteilt und in jede von diesen eines der Versuchstiere gebracht. Danach wurde die Zahl der nach einer bestimmten Zeit (der Versuchszeit) tot bzw. lebend vorgefundene Tiere notiert.

Als wichtigste Lehre ergab sich aus diesen Vorversuchen, dass es unbedingt notwendig war, mit absolut frischen Lösungen zu arbeiten. Bei den eigentlichen Versuchen kamen daher die Lösungen unmittelbar nach ihrer Anfertigung zur Verwendung. Außerdem wurde eine Versuchsteilie mit älteren Lösungen ausgeführt, um zu ermitteln, in welchem Grade die Giftwirkung bei längerem Stehen abnimmt.

Die Versuchszeit spielt bei jenen physiologischen Versuchen eine wichtige Rolle. WASICKY (1923, 1924) empfiehlt als geeignete Versuchszeit eine halbe Stunde. Es ist aber fraglich, ob dieselbe nicht doch zu kurz bemessen ist. Bei der oben beschriebenen Versuchsanordnung, wo die Versuchstiere in der Giftlösung eingetaucht liegen, so dass die Giftlösung direkt durch die Haut in sie hineinpermeieren kann, wird die Permeation für die verschiedenen Substanzen verschieden schnell vor sich gehen. Und da weiter die Giftwirkung des Stoffes natürlich durch seine Konzentration in der Zelle und nicht ausserhalb derselben bestimmt wird, so folgt daraus, dass man bei kurzer Versuchsdauer für einen schneller permeierenden Stoff eine grössere Giftwirkung als für einen langsamer permeierenden erhält, dessen Giftwirkung sonst womöglich grösser wäre. Bei meinen Versuchen bediente ich mich im allgemeinen einer längeren Versuchszeit.

Nachstehend folgt eine Übersicht über die Resultate meiner diesbezüglichen Versuche. Die Versuchstemperatur betrug 19°—22°.

### Aspidin.

Frisch bereitete Stammlösung farblos, nahm aber schon nach einigen Tagen eine braungelbe Tönung an, während die Giftwirkung gleichzeitig allmählich sank.

*Versuche mit Regenwürmern.* Stammlösung mit MgO: letale Konzentration nach 6—8 Stunden 0.1—0.2 mg/100 ml (drei Versuchsreihen). — Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 0.2 mg/100 ml (eine Versuchsreihe), nach 6—8 Stunden 0.08—0.05 mg/100 ml (drei Versuchsreihen). — 15 Tage alte Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 10 mg/100 ml.

*Versuche mit Froschlarven.* Bei diesen Versuchen wurde nur NH<sub>3</sub>-Lösung verwendet. In der Stammlösung starben die Tiere nach 7—8 Min. (15 Proben). — Letale Konzentration nach 2 Stunden 0.8—0.5 mg/100 ml (vier Versuchsreihen).

### Flavaspidsäure.

Stammlösung schwach gelblich, nach einem Tage trat aber Missfärbung ein unter gleichzeitiger allmählicher Abnahme der Giftwirkung.

*Versuche mit Regenwürmern.* Stammlösung mit MgO: letale Konzentration nach 6—8 Stunden 0.4—0.5 mg /100 ml (zwei Versuchsreihen). — Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 1 mg/100 ml (eine Versuchsreihe), nach 6—8 Stunden 0.2—0.4 mg/100 ml (drei Versuchsreihen). — 10 Tage alte Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 10 mg/100 ml.

*Versuche mit Froschlarven.* Stammlösung mit NH<sub>3</sub>. In dieser starben die Tiere nach 11—13 Min. (15 Proben): letale Konzentration nach 2 Stunden 0.8—1 mg/100 ml (vier Versuchsreihen).

### Filixsäure.

Frische Stammlösung hellgelb, wurde aber nach einem Tage dunkel unter rascher Abnahme der Giftwirkung.

*Versuche mit Regenwürmern.* Stammlösung mit MgO: letale Konzentration nach 6—8 Stunden 0.5—1 mg/100 ml (zwei Versuchsreihen). — Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 2—3 mg/100 ml (eine Versuchsreihe), nach 6—8 Stunden 0.8—0.5 mg/100 ml (drei Versuchsreihen). — Eine 22 Tage alte Stammlösung mit NH<sub>3</sub> hatte bereits ihre Wirkung völlig eingebüßt.

*Versuche mit Froschlarven.* Stammlösung nur mit NH<sub>3</sub>: in dieser starben die Tiere nach 18—20 Min. (15 Proben); letale Konzentration nach 2 Stunden 1—3 mg/100 ml (vier Versuchsreihen).

### Albaspidin.

Frische Stammlösung farblos, ging aber alsbald in braungelb über. Auch ihre Wirkung nahm bei längerer Aufbewahrung ab.

*Versuche mit Regenwürmern.* Stammlösung mit MgO: letale Konzentration nach 6—8 Stunden 0.5—0.8 mg/100 ml (drei Versuchsreihen) — Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 0.5 mg/100 ml, nach 6—8 Stun-

den 0.3—0.5 mg/100 ml (drei Versuchsreihen). — 12 Tage alte Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 5 mg/100 ml.

*Versuche mit Froschlarven.* Stammlösung nur mit NH<sub>3</sub>: in dieser starben die Tiere nach 20—40 Min. (20 Proben); letale Konzentration nach 2 Stunden 3—5 mg/100 ml.

#### Aspidinol.

Bei der Bereitung der 0.01 %igen Aspidinol-Stammlösung durch Auflösung des Stoffes in Ammoniak nebst darauffolgender Verdünnung und Neutralisation mit Chlorwasserstoffssäure (S. 52) konnte der Neutralpunkt nicht erreicht werden, ohne dass das Aspidinol vorher erneut ausgefällt wurde. Die Neutralisation konnte daher nur so weit geführt werden, dass sich das Aspidinol gerade noch in der Lösung erhielt, die also stets schwach alkalisch blieb. Bei der Verdünnung mit Leitungswasser für die Versuchslösungen wurde die alkalische Reaktion jedoch bedeutend geschwächt. Auch die mit MgO bereitete Stammlösung reagierte auf Lackmuspapier schwach alkalisch. Blindproben mit der entsprechenden Lösung, aber ohne Zusatz von Aspidinol, erwiesen jedoch, dass die Versuchstiere in derselben mindestens einen Tag am Leben blieben.

Sowohl die MgO- als die NH<sub>3</sub>-Stammlösung waren frisch zubereitet schön gelb, nahmen aber bald einen dunklen Farbton an und büssten bei längerer Aufbewahrung ihre Wirkung allmählich ein.

*Versuche mit Regenwürmern.* Stammlösung mit MgO: letale Konzentration nach 2 Stunden 1—2 mg/100 ml (eine Versuchsreihe), nach 6—8 Stunden 0.5—0.6 mg/100 ml (drei Versuchsreihen). — Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 2 mg/100 ml (eine Versuchsreihe), nach 6—8 Stunden 0.5—0.6 mg/100 ml. — 10 Tage alte Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration nach 2 Stunden 10 mg/100 ml.

*Versuche mit Froschlarven.* In der mit MgO bereiteten Stammlösung starben die Versuchstiere nach 25—40 Min. (20 Proben). Die mit NH<sub>3</sub> bereitete Stammlösung war infolge ihrer alkalischen Reaktion (freies NH<sub>3</sub>) für diese Versuche unbrauchbar. — Stammlösung mit MgO: letale Konzentration nach 2 Stunden 0.5—0.6 mg/100 ml (zwei Versuchsreihen). — Stammlösung mit NH<sub>3</sub>: letale Konzentration 0.5—0.6 mg/100 ml (drei Versuchsreihen).

#### Phloraspin.

Stammlösung schwach gelblich. Von diesem Stoff standen für die physiologischen Versuche so geringe Mengen zur Verfügung, dass sie nur für einen orientierenden Versuch ausreichten. Dieser erwies, dass das Phloraspin zu den weniger wirksamen Farnbestandteilen gerechnet werden kann. Die einschlägige Literatur enthält keine Angaben über die Wirkung dieses Stoffes.

In der Stammlösung starben die Versuchstiere (Froschlarven; 10 Proben) nach 22—26 Minuten.

Die orientierenden Versuche zeigen, dass sämtlichen untersuchten Stoffen eine bestimmte Giftwirkung zukommt, wie auch, dass das Aspidin von allen der giftigste ist. Im übrigen liessen die Versuche erkennen, dass die mit NH<sub>3</sub> bereiteten Lösungen wirksamer als die mit MgO bereiteten waren. Dies könnte

entweder so erklärt werden, dass der Giftstoff sich in den letzteren nicht vollständig löst, oder auch so, dass sich die Giftwirkung in diesen schwach alkalischen Lösungen anders als in den annähernd neutralen Ammoniaklösungen äussert. Wie wir später sehen werden, dürfte die letztere Alternative die richtige sein.

## 2. Versuche bei bestimmtem pH-Wert.

Im Sommer 1943 fanden die endgültigen physiologischen Versuche statt. Als Versuchsmaterial dienten Regenwürmer. Um möglichst genau vergleichbare und von äusseren Faktoren unabhängige Ergebnisse zu erzielen, wurde stets die Giftwirkung zweier Stoffe gleichzeitig geprüft. Als einer dieser Stoffe diente in jedem Versuch das Aspidin, dem somit die Rolle einer Test- oder Standardsubstanz zugeteilt wurde.

Den zweiten wichtigen Unterschied gegenüber den orientierenden Versuchen wie auch den Versuchen sämtlicher früheren Autoren bildete der Umstand, dass die Giftlösungen stets auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt wurden. Dies hatte nämlich, wie sich erwies, einen ganz deutlichen Einfluss auf die Resultate. Zur Erzielung eines bestimmten pH-Wertes in den Lösungen wurde auf folgende Weise verfahren.

Frisch bereitete Stammlösungen mit  $\text{NH}_3$  (siehe oben S. 52) wurden mit einer Phosphatpufferlösung von bestimmtem pH-Wert auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Phosphatpufferlösung wurde nach SÖRENSEN (JÖRGENSEN 1935) durch Mischen gegebener Mengen 1/15 mol.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 1/15 mol.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hergestellt und dann noch mit dem Eigenvolumen Leitungswasser verdünnt. Mit der so gewonnenen, in bezug auf Phosphate also 1/30 molaren Pufferlösung wurden dann die für die endgültigen Versuche vorgesehenen Stammlösungen verdünnt. Die verwendeten Phosphatreagenzien waren von Schering-Kahlbaum, signiert »nach SÖRENSEN».

Die Versuche wurden teils bei pH 7, teils, um dem im Darm herrschenden natürlichen Milieu des Bandwurms möglichst nahe zu kommen (der pH-Wert im Darmkanal beläuft sich bekanntlich auf 8.3), bei pH 8 ausgeführt. Schliesslich erfolgte noch eine Versuchsreihe bei pH 8.3 mit Aspidin und Flavaspidsäure; als Puffer diente hierbei SÖRENSENS Boratlösung (JÖRGENSEN 1935), weil sich Phosphatpuffer nicht zur Bereitung von pH 8.3-Lösungen eignet.

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde in sämtlichen Lösungen kontrolliert: in den pH 7-Proben mit Bromthymolblau und in den pH 8- und pH 8.3-Proben mit Kresolrot; als Vergleichslösungen dienten reine, nach Sörensen angefertigte Pufferlösungen.

Die in den Lösungen herrschende Temperatur wurde für jede Versuchsreihe notiert. Während des Versuches vom Morgen bis zum Abend stieg die Temperatur um einen Grad. Bei jeder Versuchsreihe wurde die Anzahl der nach 2, 4 und 8 Stunden tot bzw. lebend vorgefundenen Würmer verzeichnet. Jede Versuchsreihe enthielt auf die verschiedenen Konzentrationen je fünf Versuchstiere. Als tot wurden solche Tiere betrachtet, die nicht mehr auf Nadelstiche reagierten. Die für den Blindversuch vorgesehenen Kontrolllösungen wurden so zubereitet, dass man die mit  $\text{NH}_3$  ohne Zusatz des Giftstoffes bereitete und mit  $\text{HCl}$  neutralisierte Stammlösung mit dem Eigenvolumen Pufferlösung verdünnte. In diesen Lösungen lebten die Würmer mindestens einen Tag.

Die Resultate der Versuche sind in den Tabellen 2—10 zusammengefasst. In diesen ist die Konzentration der Stoffe in mg je 100 ml der Lösung angegeben. In den Kolumnen findet man die Anzahl der jeweils tot vorgefundenen Würmer.

Überblicken wir die Resultate dieser Versuche, so können wir feststellen, dass sie sich im grossen und ganzen mit denen der orientierenden Versuche decken. Sämtliche untersuchten Farmbestandteile üben eine bestimmte Giftwirkung aus. Dabei zeigt sich das Aspidin in sämtlichen Versuchen den anderen überlegen. An zweiter Stelle steht, gleichfalls in sämtlichen Versuchen,

Tabelle 2. *Aspidin-Flavaspidsäure bei pH 7.*

	Versuchszeit Stunden	Konzentration mg/100 ml						
		0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8
Aspidin .....	2	0	0	1	2	5	—	—
25.8.43 .....	4	0	0	4	5	5	—	—
20°—21° .....	8	0	5	5	5	5	—	—
Flavaspidsäure	2	—	—	0	0	0	2	5
25.8.43 .....	4	—	—	0	1	3	5	5
20°—21° .....	8	—	—	0	4	5	5	5
Aspidin .....	2	0	0	1	0	5	—	—
30.8.43 .....	4	0	0	1	5	5	—	—
20°—21° .....	8	0	0	5	5	5	—	—
Flavaspidsäure	2	—	—	0	0	0	3	5
30.8.43 .....	4	—	—	0	0	4	5	5
20°—21° .....	8	—	—	0	4	5	5	5

In der ersten Versuchsreihe ist das Aspidin ungefähr 4mal, in der zweiten ungefähr 3mal wirksamer als die Flavaspidsäure.

Tabelle 3. *Aspidin-Flavaspidsäure bei pH 8.*

	Versuchs-zeit Stunden	Konzentration mg/100 ml					
		0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
Aspidin .....	2	0	0	2	5	—	—
19.8.43 .....	4	0	1	5	5	—	—
19°—20° .....	8	0	5	5	5	—	—
Flavaspidsäure .....	2	—	0	0	0	4	5
19.8.43 .....	4	—	0	0	5	5	5
19°—20° .....	8	—	1	5	5	5	5
Aspidin .....	2	0	0	3	5	—	—
20.8.43 .....	4	0	2	5	5	—	—
19°—20° .....	8	0	5	5	5	—	—
Flavaspidsäure .....	2	—	0	0	0	3	5
20.8.43 .....	4	—	0	1	4	5	5
19°—20° .....	8	—	0	5	5	5	5
Aspidin .....	2	0	0	4	5	—	—
23.8.43 .....	4	1	2	5	5	—	—
19°—20° .....	8	2	5	5	5	—	—
Flavaspidsäure .....	2	—	0	0	1	3	5
23.8.43 .....	4	—	0	1	5	5	5
19°—20° .....	8	—	1	4	5	5	5

Auch in diesen Versuchsreihen ist das Aspidin 2—4mal wirksamer als die Flavaspidsäure.

Tabelle 4. *Aspidin-Flavaspidsäure bei pH 8.s.*

	Versuchs-zeit Stunden	Konzentration mg/100 ml					
		0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
Aspidiu .....	2	0	0	3	5	—	—
30.8.43 .....	4	0	1	5	5	—	—
20°—21° .....	8	1	5	5	5	—	—
Flavaspidsäure .....	2	—	—	0	0	2	5
30.8.43 .....	4	—	—	0	3	5	5
20°—21° .....	8	—	—	1	4	5	5

Auch bei pH 8.s ist das Aspidin ungefähr 4mal wirksamer als die Flavaspidsäure.

Tabelle 5. *Aspidin-Filixsäure bei pH 7.*

	Versuchs-zeit Stunden	Konzentration mg/100 ml							
		0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
Aspidin . . . .	2	0	0	0	3	5	—	—	—
29.8.43 . . . .	4	0	0	3	5	5	—	—	—
20°—21° . . . .	8	0	5	5	5	5	—	—	—
Filixsäure . . . .	2	—	—	—	0	0	0	3	5
29.8.43 . . . .	4	—	—	—	0	1	2	4	5
20°—21° . . . .	8	—	—	—	0	4	5	5	5
Aspidin . . . .	2	0	0	0	3	5	—	—	—
23.10.43 . . . .	4	0	0	3	5	5	—	—	—
18°—19° . . . .	8	0	3	5	5	5	—	—	—
Filixsäure . . . .	2	—	—	—	0	0	0	2	5
23.10.43 . . . .	4	—	—	—	0	0	1	5	5
18°—19° . . . .	8	—	—	—	0	2	5	5	5

In diesen Versuchen ist das Aspidin ungefähr 9—11mal wirksamer als die Filixsäure.

Tabelle 6. *Aspidin-Filixsäure bei pH 8.*

	Versuchs-zeit Stunden	Konzentration mg/100 ml						
		0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
Aspidin . . . .	2	0	0	2	5	—	—	—
19.8.43 . . . .	4	0	1	5	5	—	—	—
19°—20° . . . .	8	0	5	5	5	—	—	—
Filixsäure . . . .	2	—	—	0	0	0	1	5
19.8.43 . . . .	4	—	—	0	0	1	5	5
19°—20° . . . .	8	—	—	0	1	5	5	5
Aspidin . . . .	2	0	0	3	5	—	—	—
20.8.43 . . . .	4	0	2	5	5	—	—	—
19°—20° . . . .	8	0	5	5	5	—	—	—
Filixsäure . . . .	2	—	—	0	0	0	2	5
20.8.43 . . . .	4	—	—	0	0	4	5	5
19°—20° . . . .	8	—	—	0	4	5	5	5
Aspidin . . . .	2	0	0	2	4	—	—	—
29.8.43 . . . .	4	0	0	5	5	—	—	—
20°—21° . . . .	8	0	5	5	5	—	—	—
Filixsäure . . . .	2	—	—	0	0	0	1	4
29.8.43 . . . .	4	—	—	0	0	3	5	5
20°—21° . . . .	8	—	—	0	5	5	5	5

In den Versuchen bei pH 8 übertrifft das Aspidin die Filixsäure um etwa das 6—8fache an Wirksamkeit.

Tabelle 7. *Aspidin-Albaspidin bei pH 7.*

	Versuchszeit Stunden	Konzentration mg/100 ml						
		0.0215	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8
Aspidin .....	2	0	0	1	2	5	—	—
25.8.43 .....	4	0	0	4	5	5	—	—
20°—21° .....	8	0	5	5	5	5	—	—
Albaspidin .....	2	—	—	—	0	0	1	5
25.8.43 .....	4	—	—	—	0	0	5	5
20°—21° .....	8	—	—	—	0	5	5	5
Aspidin .....	2	0	0	0	3	5	—	—
29.8.43 .....	4	0	0	3	5	5	—	—
20°—21° .....	8	0	5	5	5	5	—	—
Albaspidin .....	2	—	—	—	0	0	4	5
29.8.43 .....	4	—	—	—	0	2	5	5
20°—21° .....	8	—	—	—	0	5	5	5

In diesem Versuchen ist das Aspidin ungefähr 4—8mal wirksamer als das Albaspidin.

Tabelle 8. *Aspidin-Albaspidin bei pH 8.*

	Versuchszeit Stunden	Konzentration mg/100 ml						
		0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
Aspidin .....	2	0	0	4	5	—	—	—
23.8.43 .....	4	1	2	5	5	—	—	—
19°—20° .....	8	2	5	5	5	—	—	—
Albaspidin .....	2	—	—	—	0	0	1	4
23.8.43 .....	4	—	—	—	0	0	4	5
19°—20° .....	8	—	—	—	0	0	5	5
Aspidin .....	2	0	0	2	5	—	—	—
27.8.43 .....	4	0	3	5	5	—	—	—
20°—21° .....	8	0	5	5	5	—	—	—
Albaspidin .....	2	—	—	—	0	0	0	5
27.8.43 .....	4	—	—	—	0	0	3	5
20°—21° .....	8	—	—	—	0	3	5	5
Aspidin .....	2	0	0	2	4	—	—	—
29.8.43 .....	4	0	0	5	5	—	—	—
20°—21° .....	8	0	5	5	5	—	—	—
Albaspidin .....	2	—	—	—	0	0	0	4
29.8.43 .....	4	—	—	—	0	0	2	5
20°—21° .....	8	—	—	—	0	2	5	5

In den Versuchen bei pH 8 erweist sich das Aspidin ungefähr 12—14mal wirksamer als Albaspidin.

Tabelle 9. *Aspidin-Aspidinol bei pH 7.*

	Versuchs-zeit Stunden	Konzentration mg/100 ml								
		0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
Aspidin .....	2	0	0	0	3	5	—	—	—	—
4.9.43 .....	4	0	0	3	5	5	—	—	—	—
20°—21° .....	8	0	5	5	5	5	—	—	—	—
Aspidinol .....	2	—	—	—	—	—	0	0	0	5
4.9.43 .....	4	—	—	—	—	—	0	0	3	5
20°—21° .....	8	—	—	—	—	—	1	5	5	5
Aspidin .....	2	0	0	0	2	5	—	—	—	—
5.9.43 .....	4	0	0	5	5	5	—	—	—	—
20°—21° .....	8	0	5	5	5	5	—	—	—	—
Aspidinol .....	2	—	—	—	—	—	0	0	0	5
5.9.43 .....	4	—	—	—	—	—	0	0	5	5
20°—21° .....	8	—	—	—	—	—	0	5	5	5

In den Versuchen bei pH 7 ist das Aspidin ungefähr 30mal wirksamer als das Aspidinol.

In den stärksten Aspidinollösungen (0.0016—0.0032 %) bildete sich ein schwacher Niederschlag von Aspidinol, doch ohne erkennbaren Einfluss auf die Resultate.

Tabelle 10. *Aspidin-Aspidinol bei pH 8.*

	Versuchs-zeit Stunden	Konzentration mg/100 ml						
		0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
Aspidin .....	2	0	0	2	5	—	—	—
4.9.43 .....	4	0	2	5	5	—	—	—
19°—20° .....	8	0	5	5	5	—	—	—
Aspidinol .....	2	—	—	—	0	0	0	5
4.9.43 .....	4	—	—	—	0	1	5	5
19°—20° .....	8	—	—	—	0	5	5	5
Aspidin .....	2	0	0	2	5	—	—	—
5.9.43 .....	4	0	2	5	5	—	—	—
19°—20° .....	8	1	5	5	5	—	—	—
Aspidinol .....	2	—	—	—	0	0	0	5
5.9.43 .....	4	—	—	—	0	0	4	5
19°—20° .....	8	—	—	—	0	5	5	5

In den Versuchen bei pH 8 erweist sich das Aspidin ungefähr 8—10mal wirksamer als das Aspidinol.

die Flavaspidsäure, während die Reihenfolge der übrigen Stoffe bei verschiedenen pH-Werten einigermassen schwankt.

Ein Umstand fällt bei diesen Versuchen sofort in die Augen, der nämlich, dass die *Giftwirkung der untersuchten Stoffe bei pH 7 durchgehend höher als bei pH 8 ist*. So wirkt das Aspidin bei pH 7 zwei- bis viermal stärker als bei pH 8 (nach zwei- bzw. achtstündiger Versuchszeit), die Flavaspidsäure zwei-, das Albaspidin vier- bis achtmal und die Filixsäure zweimal stärker. Bei den pH 8.3-Versuchen mit Aspidin und Flavaspidsäure tritt ebenfalls das gleiche Verhältnis zutage, indem die Giftwirkung weiterhin abgenommen hat. Dieser Sachverhalt steht offenbar in vollem Einklang mit der allgemeinen Regel, dass das *undissoziierte Säuremoleköl giftiger als das entsprechende Anion ist*. (In den Versuchslösungen ist ja die Anzahl undissoziierter Moleküle bei pH 7 stets grösser als bei pH 8.)

Die einzige Ausnahme von dieser Regel scheint nach den Versuchen das Aspidinol zu bilden, dessen toxische Wirkung sowohl bei pH 7 als bei pH 8 die gleiche war. In diesem speziellen Falle ist die Erklärung wohl darin zu suchen, dass das Aspidinol, als Säure betrachtet, viel schwächer als die übrigen untersuchten Substanzen ist, die nach BOEHM (1901 c) als relativ starke Säuren zu gelten haben; die Flavaspidsäure als die stärkste etwas stärker als die Kohlensäure. Die erste Dissoziationskonstante der Kohlensäure ist bekanntlich  $3 \cdot 10^{-7}$ , was bedeutet, dass die Säure bei pH 7 etwa zur Hälfte in Ionen dissoziiert ist. Da von den untersuchten Stoffen Aspidin, Flavaspidsäure, Albaspidin und Filixsäure folglich ungefähr von der Stärke der Kohlensäure sind, wird derjenige Teil der Dissoziationskurven dieser Säuren, der zwischen die bei den physiologischen Versuchen angewendeten pH-Werte 7 und 8 fällt, aus dem steil aufsteigenden Abschnitt der Dissoziationskurve bestehen, woraus folgt, dass der Dissoziationsgrad von pH 7 auf pH 8 stark steigt und die physiologische Wirkung folglich in entsprechendem Grade abnimmt. Beim Aspidinol hinwieder, das nach Boehm eine sehr schwache Säure ist, wird sich die Dissoziationskurve bei pH 7 und pH 8 augenscheinlich dem asymptotisch parallel mit der x-Achse verlaufenden Teil der Kurve nähern, wo der undissoziierte Teil der Säure verhältnismässig gross, und zwar sowohl bei pH 7 als bei pH 8 annähernd gleich gross ist. Eine Folge davon ist, dass die physiologische Wirkung dieses Stoffes bei den genannten pH-Werten keinerlei Unterschiede aufweist.

Um das oben Angeführte zu beleuchten, sei hier ein Diagramm eingeschaltet (Diagramm I), in das die erste Dissoziationskurve der Kohlensäure neben einer *hypothetischen* Kurve für Aspidinol eingetragen ist, woselbst die Dissoziationskonstante des Aspidinols mit  $1 \times 10^{-9}$  bezeichnet ist.

Ein übersichtliches Bild von der Giftwirkung der untersuchten Farnbestandteile erhält man, wenn man die Versuchsergebnisse in einer graphischen

Darstellung zusammenfasst. Die Diagramme II und III zeigen die Abhängigkeit der Todesgeschwindigkeit der Versuchstiere von der Konzentration des Giftstoffes. Hierbei ist als Abszisse die Konzentration (mg/100 ml) und als Ordinate die Todesgeschwindigkeit, d. i.

1

Versuchszeit' gewählt. Beim

Auszeichnen der einzelnen Diagrammpunkte hat als Grenzkonzentration diejenige durch Interpolation bestimmte Konzentration gegeben, bei der die Hälfte (2.5) von den fünf Würmern in den einzelnen Proben starben. Ausserdem sind sämtliche Werte auf die Testsubstanz Aspidin eingestellt. Bei pH 7 ist als Standardserie für das Aspidin die Versuchsreihe vom 23. 10. 1943 gewählt, die in das Diagramm eingetragen ist.

Gegen diese Reihe sind die Werte der übrigen Stoffe gemäss den Resultaten der Parallelanalysen reduziert. Die eingezeichneten Linien ergaben sich durch Verbindung der Mittelwerte dieser Stoffe. Bei pH 8 ist entsprechender-

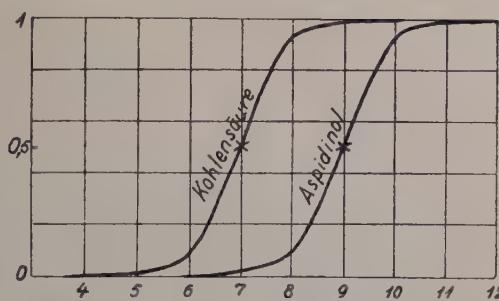


Diagramm I. Erste Dissoziationskurve der Kohlensäure nebst einer hypothetischen Dissoziationskurve für Aspidinol. Abszisse: pH, Ordinate: Dissoziationsgrad.

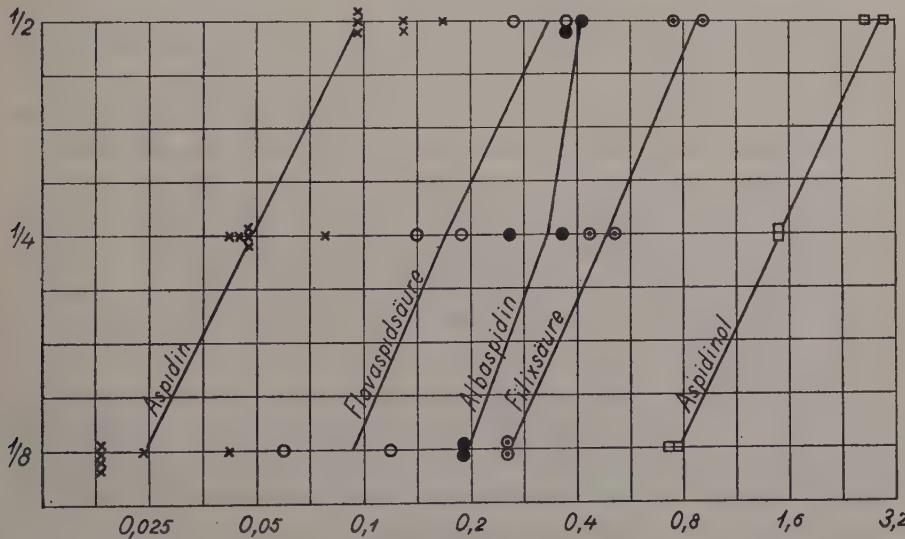


Diagramm II. Das Verhältnis der Todesgeschwindigkeit der Versuchstiere (Ordinate) zu der Konzentration (Abszisse) bei pH 7.  $\times$  Aspidin,  $\circ$  Flavaspidsäure,  $\bullet$  Albaspidin,  $\odot$  Filixsäure,  $\square$  Aspidinol. Zusammenfallende Punkte sind der Deutlichkeit halber untereinander gezeichnet.

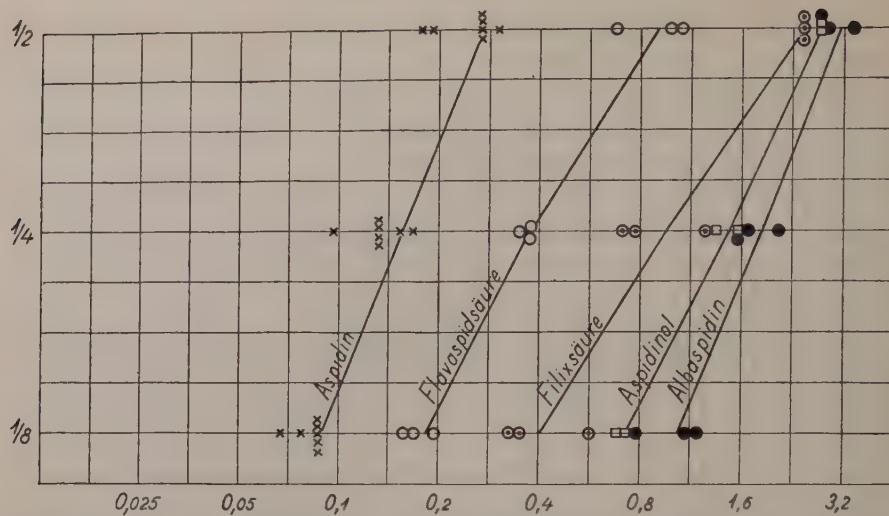


Diagramm III. Das Verhältnis der Todesgeschwindigkeit der Versuchstiere (Ordinate) zu der Konzentration (Abszisse) bei pH 8.  $\times$  Aspidin,  $\circ$  Flavaspidsäure,  $\bullet$  Albaspidin,  $\odot$  Filixsäure,  $\square$  Aspidinol. Zusammentallende Punkte sind der Deutlichkeit halber untereinander gezeichnet.

weise die Versuchsreihe vom 19.8.1943 als Standard für das Aspidin gewählt.

Ein Blick auf die Diagramme zeigt uns, dass die Verbindungslinien der auf diese Weise erhaltenen Punkte im grossen und ganzen gerade Linien sind. Hieraus ergibt sich der Schluss, dass die Todesgeschwindigkeit der Würmer bei derart angeordneten Versuchen der Konzentration direkt proportional ist.

Die Diagramme erweisen deutlich die Giftwirkung der verschiedenen Farnbestandteile im Vergleich zueinander. Diese lassen sich mithin bei pH 7 nach abnehmender Giftwirkung folgendermassen aufstellen: Aspidin — Flavaspidsäure — Albaspidin — Filixsäure — Aspidinol. Das Aspidin ist im Mittel 3—4mal stärker als die Flavaspidsäure, 6mal stärker als das Albaspidin, 10mal stärker als die Filixsäure und 30mal stärker als das Aspidinol.

Bei pH 8, das, wie erwähnt, dem im Darmkanal herrschenden pH-Wert näher entspricht und darum eher im Hinblick auf die anthelmintische Wirkung dieser Stoffe als ausschlaggebend zu betrachten sein dürfte, gestaltet sich die Reihenfolge der schwächer wirkenden Stoffe etwas anders als bei pH 7. Zu der Testsubstanz Aspidin verhalten sich die Stoffe hinsichtlich ihrer Giftwirkung bei pH 8 nach dem Diagramm wie folgt. Das Aspidin ist im Mittel 3mal stärker als die Flavaspidsäure, 6—8mal stärker als die Filixsäure, ungefähr 8—10mal stärker als das Aspidinol und etwa 12—14mal stärker als das Al-

aspidin. Die Reihenfolge bei pH 8 ist somit nach abnehmender Giftwirkung geordnet: Aspidin — Flavaspidsäure — Filixsäure — Aspidinol — Albaspidin.

### *3. Vergleich mit früheren Resultaten.*

Wie oben bereits erwähnt wurde, sind die früheren Autoren in bezug auf die Giftwirkung der Farbstoffe zu recht verschiedenen Ergebnissen gekommen. Die starke Schwankung der einzelnen Toxizitätswerte, die z. B. STRAUB (1902) beobachtet hat, hat ihn veranlasst, sich über seine Froschversuche zu äussern: »Gerade das, was ich mit den Versuchen erreichen wollte, nämlich die Rubricierung der Substanzen in eine Reihe von zunehmender Toxicität, schlug völlig fehl. Je mehr ich Einzelversuche anstellte, desto öfter wechselten die vier Glieder Filixsäure, Aspidin, Albaspidin und Flavaspidsäure ihre Plätze innerhalb der Reihe.« Untermimmt man einen Vergleich der oben von mir erzielten Werte mit den in der Literatur vorliegenden Angaben, so lässt sich auch hier in mehreren Fällen ein Unterschied verzeichnen. Ein direkter Vergleich mit den früheren Resultaten ist wohl auch nicht ohne weiteres durchführbar, wenn man sich die grosse Verschiedenheit der Versuchsbedingungen vergegenwärtigt. Ganz besonders gilt dies von dem pH-Faktor, der sich bei meinen Versuchen als ausserordentlich bedeutsam herausstellte, bisher aber noch kein einzigesmal berücksichtigt worden war.

Gewisse Gesichtspunkte ergeben sich jedoch auch schon aus dem ange deuteten Vergleich. So gut wie alle Versuche, bei denen das Aspidin mitbeteiligt war, geben an die Hand, dass dieser Stoff unter allen Farbstoffen der wirksamste ist. Die einzige Ausnahme bilden die früher erwähnten Bandwürmwerte GRÖNBERGS (1935) für Aspidin und Filixsäure. Das Aspidinol wird von BOEHM (1897) als wirkungslos und von STRAUB (1902) in manchen Versuchen als wirkungslos, in anderen als schwach wirksam angegeben. In meinen Versuchen hat sich das Aspidinol bei pH 7 als schwach, d. h. als am schwächsten von allen untersuchten Stoffen, bei pH 8 hingegen als ebenso wirksam wie das Albaspidin erwiesen.

In bezug auf die Versuchsbedingungen sind mit den meinigen am nächsten verwandt die oben bereits erwähnten Regenwurmversuche YAGIS (1914) mit Filixsäure, Albaspidin und Filmaron. Von diesen sind die zwei erstgenannten Stoffe unseren Versuchen gemeinsam. Wie erwähnt, setzt Yagi die absolute Toxizitätsgrenze für die Filixsäure mit 0.0000 % und für das Albaspidin mit 0.0005 % an. Die Versuchszeit, die der von Yagi angewandten in meinen Versuchen am nächsten entspricht, ist 8 Stunden. Meine Werte für die besagten Stoffe lauten, wie aus den Tabellen hervorgeht, bei den zwei verschiedenen pH-Werten der Versuche im Mittel:

Filixsäure:	pH 7	0.0004 %
	pH 8	0.0008 %
Albaspidin:	pH 7	0.0002 %
	pH 8	0.0016 %

Yagis Wert für Albaspidin, 0.0005 %, reiht sich also zwischen den beiden von mir erzielten Werte ein, während der entsprechende Wert für Filixsäure, 0.0004 %, ungefähr gleich dem meinigen bei pH 8 ist.

Diese Versuche repräsentieren natürlich nicht ein direktes Mass für die anthelmintische Wirkung der untersuchten Substanzen oder, mit anderen Worten, für ihr Vermögen, einen Bandwurm abzutreiben. Nach den oben besprochenen Untersuchungen von STRAUB sind die fraglichen Phlorogluzinderivate in erster Linie als ausgeprägte Muskelgifte und zweitens als Gifte des zentralen Nervensystems und des Herzens zu betrachten. Ihre pharmakologische oder anthelmintische Wirkung beruht nach dem genannten Autor auf der lähmenden Wirkung, die sie auf die Muskulatur des Bandwurms ausüben, so dass dieser sozusagen gezwungen wird, seinen Griff am Wirtsorganismus zu lockern, um dann durch Abführmittel aus dem Darm vertrieben werden zu können. Auf diesem Hintergrund betrachtet, dürfte man annehmen können, dass der Giftwirkung, die sich bei Versuchen wie den oben beschriebenen ergibt, im grossen und ganzen auch die anthelmintische Wirkung entspricht, die diese Stoffe ausüben.

In der Literatur begegnet man nur spärlichen Berichten über Versuche, bei denen die isolierten Farngifte als Bandwurmmittel an Menschen ausprobirt worden wären. RULLE (nach TSCHIRCH 1923) gibt im Anschluss an seine Versuche mit roher ausgefällter Filixsäure (POULSSONS wirksame Form der Filixsäure; es dürfte sich jedoch vermutlich um Rohfilizin gehandelt haben) an einer grossen Zahl von Patienten, dass 0.9—1.2 g in der Regel ausgereicht hätten, den Bandwurm, *Bothriocephalus latus*, abzutreiben. JACQUET (1904) führt drei Fälle von Versuchen mit Filixsäure in Dosen von 1.0 bzw. 0.8 und 0.6 g an. Sämtliche Versuche fielen negativ aus. Nur in den zwei ersten Fällen gingen vereinzelte Stücke des Wurmes ab. Bei drei Kuren mit je 0.5 g Albaspidin erhielt Jacquet ein positives und zwei negative Resultate. Ein Versuch mit 0.6 g Flavaspiridsäure schliesslich resultierte im Abgang einer ungefähr 60 cm langen Proglottidenreihe ohne Kopf. BOEHM (1897) führt einen Fall an, wo nach der Verabreichnung von 0.1 g Aspidin Proglottiden ohne Kopf abgetrieben wurden; der Kopf folgte am nächsten Tage bei Verabreichung einer üblichen Dosis *Extractum Filicis*.

Bei einigen Versuchen mit von mir dargestelltem Aspidin, die im Herbst 1939 unter der Aufsicht von Dr. med. JOHANNES HEINONEN an einer Anzahl von Wurmpatienten im Militärlazarett zu Viborg ausgeführt wurden, waren

folgende Resultate zu verzeichnen. Acht Proben zu je 0,3 g Aspidin ergaben durchgehend positive Reaktion, so auch acht Proben mit 0,2 g, während von acht Proben mit 0,1 g fünf positiv und drei negativ ausfielen.

## VII. Die Filixdroge in verschiedenen Pharmakopöen.

Seit die Gebrüder PESCHIER im Jahre 1825 das Ätherextrakt von *Dryopteris filix mas* als Anthelmintikum einführten, ist diese Arzneiform unter allen als Wurmmittel herangezogenen Farnpräparaten die vorherrschende gewesen. Dies geht deutlich u. a. daraus hervor, dass die Pharmakopöen im allgemeinen das Ätherextrakt der Farndroge neben dem Wurzelstock anführen. Dabei wird von fast allen europäischen Pharmakopöen der seit alters bekannte Farn *Dryopteris filix mas* als Stammpflanze für die Extraktherstellung vorgeschrieben, obgleich man, wie aus dem Obigen hervorgegangen sein dürfte, später zu der Erkenntnis gekommen ist, dass auch den Wurzelstöcken anderer Farnarten die gleichen wurmabreibenden Eigenschaften wie der offizinellen Drog zukommen. Die einzigen Ausnahmen hiervon bilden die 1939 erschienene erste Auflage der estnischen Pharmakopöe und die erste Auflage der lettischen Pharmakopöe von 1940. Jene schreibt nämlich die zwei nahe verwandten Arten *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca*, diese nur eine dieser beiden Arten, *D. spinulosa*, als Stammpflanze für die Extraktherstellung vor.

Wie aus den obigen Ausführungen bereits zum Teil hervorgegangen sein dürfte, ist durch die Forschungen der letzten Jahre unzweideutig erwiesen worden, dass sich die aus den Arten *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* hergestellte Droe vollauf mit der *D. filix mas*-Droge messen, ja diese sogar übertreffen kann. Das Vorgehen der baltischen Pharmakopöen, die herkömmliche *Filix mas*-Droge zugunsten der *Spinulosa*- bzw. *Austriaca*-Droge zu streichen, erscheint daher durchaus wohlbegündet. In Estland liegen dieser Einstellung der offizinellen Pharmakopöe wohl die zahlreichen Untersuchungen zugrunde, die von STAMM und seinen Schülern in Dorpat ausgeführt wurden sind. Dieselben zeigen nämlich, dass der Rohaspidin- bzw. Rohfilizin-gehalt des *Spinulosa*- bzw. *Austriaca*-Extraktes bedeutend höher als der des *Filix mas*-Extraktes ist, und zwar 32—40 % gegen 22—30 % (siehe STAMM 1932). Die lettische Pharmakopöe weicht diesbezüglich von der estnischen darin ab, dass man dort nur *D. spinulosa* und nicht die beiden einander nahestehenden Farne zugleich aufgenommen findet. Dieser bemerkenswerte Unterschied von der estnischen Pharmakopöe dürfte mit Sicherheit auf die umfangreichen und mit grosser Beharrlichkeit ausgeführten Untersuchungen von MAIZITE über die anthelmintisch wirkenden Farnarten in Lettland zurückzuführen sein. Dieser richtete nämlich schon in einem frühen Stadium der Untersuchungen

seine besondere Aufmerksamkeit auf *Dryopteris spinulosa*, indem er 1922 feststellen konnte, dass das fast schon während eines ganzen Jahrhunderts in Lettland angewandte *Extractum Filicis maris Volmarense*, das stets das beste Ansehen als sicheres Anthelmintikum genossen hatte, ausschliesslich aus den Wurzelstöcken von *D. spinulosa* dargestellt wurde (MAIZITE 1943). Bei einer späteren vergleichenden Untersuchung über die Wirkung der anthelmintischen Farnrhizome nach der biologischen Wertbestimmungsmethode (als Versuchstiere dienten Kleinfische) kam Maizite (siehe 1942) zu folgenden Resultaten:

<i>Dryopteris spinulosa</i> .....	10.27 mg	(33.95 %)
<i>D. cristata</i> .....	12.24 »	(30.11 %)
<i>D. filix mas</i> .....	17.66 »	(29.41 %)
<i>D. austriaca</i> .....	18.71 »	(35.12 %)

Die Zahlen sind Mittelwerte für die Extraktmengen, die innerhalb einer halben Stunde tödlich auf die Versuchstiere wirkten. Die entsprechenden Rohaspidin- bzw. Rohfilizingehalte sind jeweils hinter den betreffenden Werten in Klammern angegeben. Auch hier frappiert das völlige Fehlen eines Parallelismus zwischen dem Rohaspidin- bzw. Rohfilizingehalt und der physiologischen Wirkung (siehe oben S. 47).

Diesen Resultaten gemäss ist *Dryopteris spinulosa* die anthelmintisch wirksamste der untersuchten Farnarten. Erst an letzter Stelle steht in MAIZITES Tabelle, trotz ihres höchsten Rohaspidingehaltes, *D. austriaca*. Über das *Austriaca*-Extrakt bemerkt Maizite, dass es seiner Wirkung nach in höchstem Grade variere. So effektiv es mitunter auch sein kann, ist es doch gewöhnlich von geringerer Wirkung als das *Spinulosa*-Extrakt. Diese Schwankungen werden von Maizite auf Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung des Rohaspidsins zurückgeführt. Das *Spinulosa*-Extrakt hingegen ist nach Maizite in bezug auf seine Wirkung bemerkenswert konstant, was nach dem Autor dem in der Droge enthaltenen hochwirksamen und beständigen Albaspidin zuzuschreiben ist.

Auf die verschiedene physiologische Wirkung von *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* hatte indessen schon im Jahre 1911 ROSENDAHL in Schweden hingewiesen, der folgende Extraktmengen der verschiedenen *Dryopteris*-Arten als Wurmmittel gegen *Bothriocephalus latus* angibt:

<i>Dryopteris filix mas</i> .....	8—10 g
<i>D. spinulosa</i> .....	4 »
<i>D. austriaca</i> .....	2 »

Der Autor führt also *Dryopteris austriaca* als die wirksamste von allen drei Arten an und empfiehlt einen Austausch des *Extractum Filicis maris* der schwedischen Pharmakopöe gegen das Extrakt von *D. austriaca*.

Noch früher, in den Jahren 1902 und 1903, hatte FISCHER (nach BERGROTH 1926) im Serafimerlazarett und in der Edgrenschen und Henschenschen Klinik in Stockholm eine vergleichende Untersuchung über das wurmabtriebende Vermögen der drei obengenannten Farnarten durchgeführt. Auf Grund seiner Versuche gibt Fischer folgende Minimaldosen der betreffenden Extrakte an:

<i>Dryopteris filix mas</i> .....	10 g
<i>D. spinulosa</i> .....	4 »
<i>D. austriaca</i> .....	4 »

In diesen Versuchen haben sich also *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* als gleich wirksam erwiesen.

Das gleiche Thema ist neuerdings von den Schweden CARLSSON & BÄCKSTRÖM (1942) einer Behandlung unterworfen worden. Ihre nach der biologischen Wertbestimmungsmethode mit Regenwürmern als Versuchsobjekten durchgeführten Untersuchungen umfassen sechs Proben mit *Dryopteris filix mas*, zwei mit *D. spinulosa* und zwei mit *D. austriaca*. Die beiden *Spinulosa*-Proben erwiesen sich als die wirksamsten. Von den zwei *Austriaca*-Proben war die eine ebenso stark wie die *Spinulosa*-Proben, die zweite annähernd ebenso stark wie die *Filix mas*-Probe.

In Schweden ist man sich also schon längst im klaren darüber gewesen, dass die *Spinulosa*- und *Austriaca*-Drogen der *Filix mas*-Droge an Wirkung überlegen sind. Doch schreibt noch die letzte Auflage der schwedischen Pharmakopöe (1925) ausschliesslich *Dryopteris filix mas* vor. Dies ist insofem bemerkenswert, als das Extrakt, dessen man sich in Schweden schon seit einer langen Reihe von Jahren zum grossen Teil bedient hat, nicht *Filix mas*-Extrakt, sondern bei Koponen in Finnland hergestelltes *Spinulosa-Austriaca*-Extrakt ist (nach BERGROTH 1926).

Die im Jahre 1937 erschienene sechste Auflage der finnischen Pharmakopöe ist nicht vom herkömmlichen Standpunkt in der *Filix*frage abgegangen, sondern schreibt fortgesetzt *Dryopteris filix mas* nebst dem entsprechenden Extrakt vor. Man fragt sich hier unwillkürlich, ob nicht eine Änderung dieser Einstellung angebracht wäre, so dass die *Spinulosa*- bzw. *Austriaca*-Droge gebührend beachtet würde. Seit LAURÉN im Jahre 1897 der Nachweis gelang, dass diese Droge ein hochwirksames Extrakt lieferte, hat man sich ihrer in unserem Lande bewusst und in grosser Ausdehnung neben der *Filix mas*-Droge bedient, mit der sie sich in bezug auf ihre Wirkung durchaus hat messen können, ja der sie in dieser Hinsicht sogar als überlegen betrachtet wurden ist. Als Beleg dafür können die im Laboratorium Koponen hergestellten wohlbekannten Aspidii spinulosi-Kapseln, Dr. Lauréns Filicon und Medicas Aspidoltabletten genannt werden, die sich allesamt von der *Spinulosa-Aus-*

*triaca*-Droge herleiten. Schon früher war diese Droge, obwohl unbewusst, in nicht geringem Masse als Beimischung in der *Filix mas*-Droge aufgetreten.

Das Problem ist auch bei uns wissenschaftlich behandelt worden. In einer im Jahre 1926 erschienenen Untersuchung konnte BERGROTH mittels der biologischen Wertbestimmungsmethode zeigen, dass das *Spinulosa*- bzw. *Austriaca*-Extrakt auf Regenwürmer eine weit stärkere Wirkung als das *Filix mas*-Extrakt ausühte. In dieselbe Richtung wiesen auch die vergleichenden Untersuchungen KILLINENS (1932) über den Rohaspidin- bzw. Rohfilizin-gehalt der aus den vorgenannten Drogen dargestellten Extrakte.

Unsere Erfahrungen sprechen also entschieden für die Aufnahme der *Spinulosa-Austriaca*-Droge in die Pharmakopöe. Dies braucht jedoch meiner Meinung nach nicht unbedingt zu bedeuten, dass die herkömmliche *Filix mas*-Droge aus dem Arzneibuch zu streichen wäre, wie dies in den baltischen Pharmakopöen geschehen ist. Im Gegenteil, hat man sich doch dieser Droge während so langer Zeit in allen europäischen Ländern mit Erfolg als Anthelmintikum bedient, dass ihre Beibehaltung in der Pharmakopöe mir durchaus motiviert erscheint.

Die Frage, ob die beiden Stammpflanzen der *Spinulosa-Austriaca*-Droge wie in Estland in die Pharmakopöe aufzunehmen sind oder ob etwa *Dryopteris austriaca*, wie in der lettischen Pharmakopöe, unberücksichtigt zu lassen ist, ist noch schwer zu beantworten. Diesbezüglich sind unsere Erfahrungen noch zu gering, da die beiden Arzneimittelfabriken, die bei uns auch Wurmmittel herstellen, nämlich das Laboratorium Koponen und die A/G Medica, keinen Unterschied zwischen den beiden Arten gemacht, sondern die gemischte Droge als Rohmaterial verwendet haben. Bei Medica hat man jedoch feststellen zu können geglaubt, dass *D. austriaca* von den beiden die schlechtere sei, eine Beobachtung, die also zugunsten der Auffassung MAIZITES spricht. Meine eigenen orientierenden Untersuchungen zeigen, wie eingangs erwähnt, keinen Unterschied in der Zusammensetzung der in den beiden Arten enthaltenen Phlorogluzinderivate, abgesehen von einer einzigen Ausnahme. Die *Dryopteris austriaca*-Proben aus Joensuu entbehren nämlich ihres wirksamsten Bestandteils, des Aspidins, während die in derselben Gegend eingesammelten *D. spinulosa*-Proben den normalen Gehalt an Aspidin aufwiesen. Auch diese Beobachtung scheint eine Stütze für die Auffassung Maizites bezüglich der variierenden Wirkung der *Austriaca*-Droge abzugeben; das Beobachtungsmaterial ist aber zu beschränkt, als dass ihm grössere Bedeutung beizumessen wäre. Schwerer fällt m. E. der Umstand ins Gewicht, dass das Material, das sowohl vom Laboratorium Koponen als von der Arzneimittelfabrik Medica zur Bereitung der *Spinulosa*-Droge herangezogen worden ist, zum überwiegenden Teil aus *D. austriaca* bestanden haben dürfte, wovon ich mich bei einem Besuch in diesen beiden Fabriken überzeugen konnte. Die gleiche

Erfahrung machte auch MAIZITE (siehe 1943) bei einem Besuch im Laboratorium Koponen. Auch die in Schweden gemachten Beobachtungen sprechen, wie vorhin erwähnt, zugunsten der Aufnahme der beiden Arten *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* in die Pharmakopöe.

Ein Umstand, dem bei der Erörterung dieser Fragen naturgemäß eine grosse Bedeutung zukommt, ist die Frage von der toxikologischen Wirkung der Filixdroge. Ausser seinem Einfluss auf die Eingeweidewürmer übt das Farnexzakt auch auf den Wirtsorganismus eine nicht geringe Wirkung aus, die sich in Form von unangenehmen Nebenerscheinungen äussert. Es ist seit langem bekannt, dass das Farnexzakt, zumal bei Verabreichung in grösseren Dosen, Störungen des Sehvermögens und sogar Blindheit, Unwohlsein, Erbrechen, Darmblutungen, Krampf, Besinnungslosigkeit und schlimmstenfalls den Tod verursacht hat. Auch in Finnland sind hin und wieder, wenn auch im Vergleich zu der Anzahl der jährlich ordinierten Filizinkuren nur äusserst selten, Todesfälle nach Einnahme von Filixexzakt eingetreten. Ein paar von diesen Fällen sind jüngsten Datums. Ob die verschiedenen Stammpflanzen bei der Extrakterstellung, also *Dryopteris filix mas*, *D. spinulosa* und *D. austriaca*, eine ungleiche toxikologische Wirkung entfalten, ist noch nicht endgültig geklärt; doch dürfte die anthelmintische Wirkung nicht parallel mit der toxikologischen verlaufen. Wäre dies der Fall, so hätte man natürlich in der *Spinulosa-Austriaca*-Droge die giftigere zu erwarten. Das ist jedoch nicht der Fall. Die Erfahrungen sprechen im Gegenteil dafür, dass gerade diese Droge die weniger giftige ist (ROSENDALH 1911; BERGROTH 1926). In Finnland ist ESKOLA (1937) beim klinischen Studium des Bilirubin gehaltes des Blutes nach Verabreichung von Wurmmitteln zu einem eindeutigen Resultat gekommen. Er hat sich dabei auf die von früher her bekannte Erscheinung gestützt, dass das Bilirubinbild des Blutes auch geringe Störungen in der Funktion der Leber empfindlich widerspiegelt. Dass auch die *Spinulosa-Austriaca*-Droge nicht völlig frei von Nebenwirkungen ist, wird z. B. durch einen von SVSI (1940) beschriebenen Fall erwiesen, der in totaler Blindheit des Patienten resultierte.

Die obigen Ausführungen zusammenfassend, möchte ich also empfehlen, dass in einer folgenden Auflage der finnischen Pharmakopöe unter *Rhizoma filicis* die Rhizome aller drei oben besprochenen Farnarten, also *Dryopteris filix mas*, *D. spinulosa* und *D. austriaca*, aufgenommen würden. Dabei müsste aber anstelle der veralteten Rohfilizinbestimmung mit dringender Notwendigkeit die Prüfung der Droge und des aus ihr bereiteten Extraktes mittels der biologischen Wertbestimmungsmethode eingeführt werden. Die vierte in unserem Lande vorkommende anthelmintisch wirkende *Dryopteris*-Art, *D. cristata*, bleibt wegen ihres relativ spärlichen Vorkommens ausser Betracht.

Die Anforderung an ein haltbares Filixpräparat. — Wie im vorherge-

henden wiederholt angedeutet wurde, hat als Wurmmittel herkömmlicherweise in erster Linie das Ätherextrakt der anthelmintischen Farmrhizome gedient, das man in den Pharmakopöen neben dem zu seiner Herstellung notwendigen Rhizom vorgeschrieben findet. Wenn die Pharmakopöen eine längere Aufbewahrung der Rhizome nicht zulassen und auch vorschreiben, dass die Bruchfläche des Rhizoms rein grün sein soll, so geschieht das, um sich vor zu alter Droe zu schützen, deren Wirkung nicht mehr die gleiche wie die der frischen Droe ist. Dies steht durchaus im Einklang mit den Erfahrungen, die man über die Wirkungsabnahme der lagernden Droe erzielt hat. Um dieselbe einigermassen zu beleuchten, seien hier einige einschlägige Werte von WASICKY (1924) und JARETZKY & PUNZEL (1938) angeführt. Ersterer gibt an, dass die Droe bei einjähriger Lagerung zwei Drittel ihrer ursprünglichen Wirkung einbüsst, während Jaretzky & Punzel für anderthalbjährige Droe das Abnahmeverhältnis  $4\frac{1}{2} : 1$  verzeichnen. MAIZITE (1943) hat bei zahlreichen Versuchen ähnliche Werte erhalten.

Für das Filixextrakt finden sich dagegen keine entsprechenden Bestimmungen hinsichtlich einer begrenzter Aufbewahrungszeit, trotzdem auch es sich als unhaltbar erwiesen hat und seine Wirkung bei längerem Stehen einbüsst. Nach STAMM (1934) unterliegen die Filixdroge wie auch das aus ihr bereitete Extrakt bei der Lagerung einem Verharzungsprozess, der sich in einem Anstieg des Rohfilizin- bzw. Rohaspidin gehaltes äussert, dem indessen keine Wirkungszunahme, sondern vielmehr eine auf dem Zerfall der genuinen Filixstoffe beruhende Abnahme der biologischen Wirkung entspricht. JARETZKY & PUNZEL (1938) haben mittels der biologischen Wertbestimmungsmethode gefunden, dass Extrakte, die üblicherweise in Flaschen aufbewahrt werden, nach einem Jahre ungefähr ein Drittel ihrer Wirkung verloren, während sich in Ampullen eingeschmolzenen Extrakte als relativ haltbar erwiesen. Auch ZOLTAN (nach Jaretzky & Punzel) hat bei Versuchen mit Blutegeln in Gelatinekapseln eingeschlossene Extrakte haltbar gefunden. Schliesslich seien hier noch einige von MAIZITES (1943) Werten angeführt, die für frisch bereitete und einige Jahre alte Extrakte bestimmt sind. Als Mass gilt die Extraktmenge, die binnen einer halben Stunde den Tod des Versuchstieres herbeiführte.

<i>Dryopteris filix mas</i>	....	1933	8.4 mg	1936	40.0 mg
<i>D. spinulosa</i>	.....	1932	5.7 "	1936	9.0 "
<i>D. austriaca</i>	.....	1932	7.8 "	1936	16.0 "

Mit diesen Tatsachen vor Augen muss der Anforderung an ein haltbares, konstant wirkendes Filixpräparat zumindet die gleiche Bedeutung beigemesen werden wie einer zuverlässigen Wertbestimmungsmethode für die Filix-droge.

Wie angedeutet wurde, dürfte nach ZOLTAN (JARETZKY & PUNZEL) *Extractum Filicis* in gelatinisierten Kapseln haltbar sein.

Jaretzky & Punzel haben in ihrer eben genannten Arbeit (1938) verschiedene Versuche ausgeführt, um mittels der biologischen Wertbestimmungsmethode die Haltbarkeit von Rohfilizin und Filmaron, teils als solchen, teils in Olivenöl gelöst, zu prüfen. Die Resultate geben an die Hand, dass Rohfilizin, im Vakuum getrocknet, praktisch unbegrenzt haltbar ist, ohne besondere Massnahmen für die Aufbewahrung zu erfordern. Rohfilizin dagegen, wie gewöhnlich während einer Stunde bei 100° getrocknet, büsste in 18 Monaten etwa die Hälfte seiner Wirkung ein. Das Filmaron zeichnete sich durch eine vorzügliche Haltbarkeit aus. Die im Vakuum getrocknete Olivenöllösung von Rohfilizin sowie das in Öl gelöste Filmaron erwiesen sich gleichfalls als haltbar.

Angesichts dieser Resultate dürfte es ein gewisses Interesse haben, zu erwähnen, dass die neueste Auflage der schweizerischen Pharmakopöe aus dem Jahre 1933 vakuumgetrocknetes Rohfilizin unter der Rubrik *Extractum filicis concentratum* statt des bisher vorgeschriebenen Ätherextraktes verzeichnet. Auch die deutsche Pharmakopöe ist in dieser Hinsicht nicht an den Ergebnissen der Forschung vorbeigegangen und hat in ihrer 1926 erschienenen sechsten Auflage von KRAFT in Öl gelöstes Filmaron unter der Bezeichnung *Aspidinolfilicinum oleo solutum* in ihren Arzneischatz aufgenommen.

Diese Massnahmen der deutschen und der schweizerischen Pharmakopöe deuten darauf, dass die Entwicklung auch auf diesem Gebiete im Begriff ist, immer reineren und konzentrierteren Präparaten zuzustreben. Verfolgt man konsequent diesen Gedankengang weiter, so ergibt sich als nächster Schritt ohne weiteres die Isolierung der wirksamen Bestandteile der Filixdroge und der Versuch ihrer Anwendung als Wurmmittel. Hier tritt jedoch die Komplikation hinzu, dass die wirksamen Substanzen zu mehreren auftreten. Man könnte sich natürlich die Anwendung eines Produktes denken, das aus sämtlichen oder der Hauptsumme der wirksamen Bestandteile aufgebaut und durch weitergehende Reinigung des Rohfilizins erhalten wäre, aber das Präparat, das sich hierdurch ergäbe, wäre, obwohl haltbar, infolge der Möglichkeiten von Variationen in seiner Zusammensetzung seiner Wirkung nach nicht konstant. Das Richtigste wäre wohl zu treffen, wenn man eine, am liebsten die wirksamste der Substanzen auswählte, die zugleich in der Droge so reichlich vertreten wäre, dass ihre Darstellung nicht auf allzu grosse Schwierigkeiten stiesse.

Nach den im Vorhergehenden geschilderten physiologischen Versuchen ist das Aspidin der weitaus wirksamste aller dargestellten Farnbestandteile. Es hat ausserdem gegenüber den anderen Farnbestandteilen den Vorzug, dass es der in der *Spinulosa*- bzw. *Austriaca*-Droge am reichlichsten vertretene

Stoff und gleichzeitig leicht darstellbar ist. Da ferner auch die wenigen Versuche, die mit Aspidin zum Abtreiben von Bandwurm ausgeführt wurden, günstig ausgefallen sind und dadurch gezeigt haben, dass sich das Aspidin gut als Wurmmittel für den Menschen eignet, sind meines Erachtens grosse Möglichkeiten dafür vorhanden, dass gerade in dem Aspidin ein solches Präparat vorliegt. Es sind natürlich fortgesetzte Studien über den Stoff erforderlich, zumal im Hinblick auf seine richtige Dosierung, sobald diese aber ausexperimentiert worden ist, besitzen wir im Aspidin ein konstant wirkendes und leicht dosierbares Bandwurmmittel, das, sofern sich seine fabrikmässige Darstellung als möglich erweist, Anspruch auf einen festen Platz in der Pharmakopöe machen darf.

### VIII. Zusammenfassung.

1. Die zwei nahe verwandten Arten *Dryopteris spinulosa* und *D. austriaca* wurden auf den Gehalt ihrer Rhizome an verschiedenen Phlorogluzinderivaten orientierend untersucht. Dabei ergab sich zwischen ihnen weder qualitativ noch quantitativ ein wesentlicher Unterschied. Folgende mittlere Gehalte an den verschiedenen Phlorogluzinderivaten wurden gefunden:

*Dryopteris spinulosa*: Aspidin 0.1—0.2 %, Albaspidin bis 0.01 %, Flavaspidsäure 0.02—0.05 %, Aspidinol 0.03 %.

*Dryopteris austriaca*: Aspidin 0.1—0.2 %, Albaspidin bis 0.01 %, Flavaspidsäure 0.04—0.05 %, Aspidinol 0.012 %.

Die Analysen wurden nach einer modifizierten Form einer seinerzeit von BOEHM ausgearbeiteten Methode zur Isolierung der Phlorogluzinderivate aus den Farnrhizomen durchgeführt.

2. Die isolierten Phlorogluzinderivate wurden näher untersucht, um Methoden zu ihrem qualitativen Nachweis in den Drogenproben zu finden. Dabei kam das Mikrosublimationsverfahren zur Anwendung. Direkt sublimierbar sind von den untersuchten Stoffen bei gewöhnlichem Luftdruck Aspidinol und Albaspidin, im Vakuum Aspidin und Flavaspidsäure. Die Filixsäure zerfällt bei der Erhitzung sowohl unter Normaldruck als im Vakuum, wobei Albaspidin gebildet wird. Alle diese Stoffe sind mittels der Mikroschmelzpunktmethode in ihren betreffenden Sublimaten nachweisbar, desgleichen (jedoch mit Ausnahme des Aspidinols) durch Zutröpfeln von Alkohol zum Präparat, wobei für die betreffenden Stoffe typische Kristalle gebildet werden (Abb. 11, 15, 19, 20 und 22). Das Aspidinol kann durch Erhitzen des Sublimats auf 120°, wo der Stoff in die für ihn kennzeichnende Kristallform, tafelförmige Kristalle (Abb. 24), übergeht, ferner durch Zugabe eines Semikarbazidreagens nachgewiesen werden (Abb. 29).

Diese Erfahrungen bildeten die Grundlage für die Untersuchung der einzelnen Drogen durch Mikrosublimation. Folgende Farmarten wurden untersucht: *Dryopteris spinulosa*, *D. austriaca*, *D. filix mas*, *D. cristata* und *Athyrium filix femina*. Aspidinol (Abb. 34, 35, 42, 43, 49, 50, 54 und 55) und Albaspidin (Abb. 36, 45, 51 und 56) konnten in der angegebenen Weise in den Wurzelstöcken sämtlicher Arten, mit Ausnahme der zuletzt genannten, konstatiert werden. Aspidin wurde durch Vakuumsublimation im Rhizom von *Dryopteris spinulosa* (Abb. 37 und 38) und *D. austriaca* (Abb. 44 und 46) festgestellt.

3. Die physiologische Wirkung der isolierten Phlorogluzinderivate wurde in Tierversuchen geprüft. Als Versuchstiere dienten Regenwürmer. Die Versuche zeigen, dass sämtlichen untersuchten Filixstoffen den Versuchstieren gegenüber eine bestimmte Giftwirkung zukommt. Diese hat sich als weitgehend abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration der Versuchslösung erwiesen. Aus den Diagrammen II und III (S. 63 und 64) ersieht man die Giftwirkung der untersuchten Stoffe, miteinander bei pH 7 und pH 8 nach den Versuchszeiten von 2, 4 und 8 Stunden verglichen. In sämtlichen Versuchen hat sich das Aspidin als der wirksamste Stoff ergeben.

4. Als Stammpflanzen der *Rhizoma Filicis*-Droge in einer folgenden Auflage der finnischen Pharmakopöe werden empfohlen: *Dryopteris filix mas*, *Dryopteris spinulosa* und *Dryopteris austriaca*.

5. Schliesslich wird noch die Möglichkeit der Aufnahme von Aspidin als konstant wirkendes Wurmmittel in die Pharmakopöe diskutiert.

## Literaturverzeichnis.

ALM, TH., 1935, Om rhizoma och extractum filicis. — Farm. Revy, 34, p. 309.

ANSELMINO, O. und GILG, E., 1928, Kommentar zum Deutschen Arzneibuch 6. Ausgabe 1926. Berlin.

ÅNGMAN, A., 1900, Rhizoma Filicis och dess förväxlingar. — Svensk Farm. Tidskrift, 4, p. 193.

BÄRLUND, H. siehe KARMA.

BERGROTH, G., 1926, En jämförande biologisk prövning av ormbunksrotextrakt. — Finska Läkarsällsk. Handl., 68, p. 650.

BOEHM, R., 1897, Beiträge zur Kenntnis der Filixsäuregruppe. — Arch. exp. Path. Pharmakol., 38, p. 35.

—»— 1898, Ueber homologe Phloroglucine aus Filixsäure und Aspidin. — Lieb. Ann., 302, p. 171.

—»— 1899, Ueber Filicinsäure. — Ibid., 307, p. 249.

—»— 1901 a, Ueber Filicinsäurebutanon. — Ibid., 318, p. 230.

—»— 1901 b, Ueber Aspidinol. — Ibid., 318, p. 245.

—»— 1901 c, Ueber die Konstitution der Flavaspidinsäure, der Filixsäure, des Albaspidins und über zwei bemerkenswerte Reaktionen in der Phloroglucinreihe. — Ibid., 318, p. 253.

—»— 1903 a, Ueber Methylenverbindungen in der Phloroglucinreihe. — Ibid., 329, p. 269.

—»— 1903 b, Einige neue Beobachtungen über Flavaspidinsäure. — Ibid., 329, p. 310.

—»— 1903 c, Ueber Aspidin. — Ibid., 329, p. 321.

—»— 1903 d, Ueber Phloraspin. — Ibid., 329, p. 338.

CARLSSON, T. & BÄCKSTRÖM, K., 1942, Värdebestämning av Dryopterisrotsstockar och därmed sammanhängande problem. — Stockholm.

ESKOLA, O., 1937, Matolääkkeiden myrkyllisyystestä bilirubiinitutkimusten valossa. — Duodecim, 53, p. 417.

FICHTER, M., 1938, Anwendung der chromatographischen Adsorptionsanalyse in der Pharmazie. — Pharm. Acta Helv., 13, p. 123.

FISCHER, R., 1934, Apparate und Methode der Mikrosublimation. — Mikrochemie, 15, p. 247.

—»— & PAULUS, W., 1935, Der mikrochemische Nachweis von Monosacchariden. — Arch. Pharm., 273, p. 83.

GRABOWSKY, A., 1867, Filixsäure. — Lieb. Ann., 143, p. 279.

GRÖNBERG, J., 1935, Die biologische Vorprüfung unbekannter Arzneimittel. — ABDERHALDEN: Handb. biolog. Arbeitsmeth., Abt. IV. Teil 7 B, p. 1506, Berlin.

HAUSMANN, A., 1899, Über Extractum Filicis aethereum. — Arch. Pharm., 237, p. 544.

HÖHLKE, F., 1902, Ueber die Harzbehälter und die Harzbildung bei den Polypodiaceen und einigen Phanerogamen. — Beih. Bot. Centralbl., 11, p. 1.

JACQUET, A., 1904, Die wirksamen Bestandteile des Extractum Filicis maris und ihre therapeutische Verwendung. — Therap. Monatsh., 18, p. 391.

JARETZKY, R. & PUNZEL, W., 1938, Standardisierung und Stabilisierung von Drogen der Filixgruppe. — Arch. Pharm., 276, p. 559.

JODLBAUER, A., 1932, Die hämolytische Wirkung der Stoffe der Filixgruppe. — Arch. exp. Path. Pharmakol., 164, p. 457.

JÖRGENSEN, H., 1935, Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration. Dresden & Leipzig.

KARMA, H., (= BÄRLUND), 1938 a, Rhizoma filicis-rohdoksen mikrohärmeistä. — Suomen Apteekkariyhdistyksen Aikakauslehti, 27, p. 259.

—»— 1938 b, Über die Mikrosublimate von Rhizoma hydrastidis. Ibid., 27, p. 305.

—»— 1938 c, Über die Mikrosublimate des Opiums. — Ibid., 27, p. 320.

—»— 1939, Mikrosublimatuntersuchungen an einigen cumarinhaltigen Drogen. — Ibid., 28, p. 77.

KARRER, P., 1919, Synthetische Versuche in der Filixgruppe. — Helv. Chim. Acta, 2, p. 466.

—»— & WIDMER, FR., 1920, Die Synthese des Aspidinols. — Ibid., 3, p. 392.

KILPINEN, K., 1932, Über den Wert der finnischen Dryopteris Filix mas- und Dryopteris spinulosaextrakte. — Suomen Apteekkariyhdistyksen Aikakauslehti, 21, p. 149.

KOFLER, L., 1934, Über einen Mikroschmelzpunktsapparat mit am Apparat geeichtem Thermometer. — Mikrochemie, 15, p. 242.

—»— & LINDPAINTNER, E., 1938, Mikroskopische Untersuchungen an polymorphen Substanzen. — Ibid., 24, p. 43.

—»— & MÜLLER, E., 1930, Über den Einfluss von Standort und Sammelzeit auf Rhizoma Filicis. — Arch. Pharm., 268, p. 644.

KRAFT, F., 1903, Filmaron, der wirksame Bestandteil des Filixextraktes. — Pharm. Ztg., 48, p. 275.

—»— 1904, Über das Filmaron, die anthelmintisch wirkende Substanz des Filixextraktes. — Arch. Pharm., 242, p. 489.

LAURÉN, W., 1896, Rhizoma Filicis und dessen Verwechselungen. — Schw. Wochenschr. Chem. Pharm., N:o 48. Zit. nach einem Referat in den Jahresber. Pharm., 31, (1898), p. 99.

—»— 1897, Rhizoma Aspidii spinulosi Sw. och eterextraktet därav såsom medel mot mask. — Finska Läkaresällsk. Handl., 39, p. 1225.

—»— 1898, 1897 års inhemska filixextrakter. — Ibid., 40, p. 1.

—»— 1908, Filicon. Ett nytt anthelminticum. — Ibid., 50, p. 94.

LUCK, E., 1845, Ueber einige Bestandteile der Rad. Filicis. — Lieb. Ann., 54, p. 119.

MAIZITE, J., 1938, Sekslapu papardes extrakt. — Acta Univ. Latv. Kim. Fak. ser., IV, 5, p. 115.

—»— 1942, Zur Kenntnis der kristallinischen Farnbestandteile. Autoref. in Arch. Pharm., 280, p. 173.

—»— 1943, Über die Bereitung des Farnextraktes. — Ibid., 281, p. 217.

OELKERS, H.-A., 1943, Pharmakologische Grundlagen der Behandlung von Wurmkrankheiten. Leipzig.

PHARMACOPOEA ESTONICA. Ed. I. Tallin 1937.

—»— FENNICA. Ed. VI. Helsinki 1937.

—»— GERMANICA. Ed. VI. Berlin 1926.

—»— HELVETICA. Ed. V. Bern 1935.

—»— LATVIENSIS. Ed. I. Riga 1940.

—»— SUECICA. Ed. X. Stockholm 1925.

POULSSON, E., 1892, Ueber den giftigen und bandwurmtreibenden Bestandteil des ätherischen Filixextracts. — Arch. exp. Path. Pharmakol., 29, p. 115.

—»— 1895, Ueber Polystichumsäure. — Ibid., 35, p. 97.

—»— 1898, Untersuchungen über Aspidium spinulosum. — Ibid., 41, p. 246.

ROBERTSON, A. & SANDROCK, W., 1933, Constituents of *Filix* Mas. I—II. — Journ. Chem. Soc., p. 819, 1617.

ROSENDAHL, H. V., 1911, Undersökningar över anthelmintiskt verksamma ormbunkar samt av dem beredda droger och eterextrakter. — Svensk. Farm. Tidskrift, 15, p. 85.

SANTESSON, C. G., 1903, Om körtelhårens förhållande till fjällen hos *rhizoma filicis*. — Ibid., 7, p. 17.

SCHOENHEYDER, F., 1939, The biological assay of extract of male fern. — Quart. Journ. Pharm. Pharmakol., 12, p. 75.

STAMM, J., 1931, Rhizoma *Filicis maris* kui farmakopöadroog Eestis. — *Pharmacia*, 11, p. 159.

—»— 1932, Über den gegenwärtigen Stand der Filixfrage. — Suomen Aptekariyhdistyksen Aikakauslehti, 21, p. 1.

—»— 1934, Über Wert- und Frischezustandsbestimmung der Filixdrogen resp. Filixextrakte. — Eesti—Suomi—Unkari farm. yhd. julkaisuja, Helsinki.

STRAUB, W., 1902, Pharmakologische Studien über die Substanzen der Filix-säuregruppe. — Arch. exp. Path. Pharm., 48, p. 1.

—»— 1920, Die Filixgruppe. — HEFFTER, A., Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. II. 1 Hälfte, Berlin.

SYSLI, R., 1940, Nääkhermon surkastuminen matolääkemyrkkyksien seurausksesta. — Duodecim, 56, p. 514.

THOMS, H., 1924—1929, Handbuch der praktischen und wissenschaftlichen Pharmazie. Berlin und Wien.

TSCHIRCH, A., 1923, Handbuch der Pharmakognosie, Bd. III, 1 Abt., Leipzig.

—»— & OESTERLE, 1900, Anatomischer Atlas der Pharmakognosie und Nahrungsmittelkunde. Leipzig.

TUNMANN, O. & ROSENTHALER, L., 1931, Pflanzenmikrochemie. Leipzig.

WASICKY, R., 1923, Zur biologischen Wertbestimmung von *Filix mas*. — Arch. exp. Path. Pharmakol., 97, p. 454.

—»— 1924, Weitere Beiträge zur biologischen Wertbestimmung von *Filix mas*. — Ibid., 103, p. 311.

—»— 1936, Leitfaden für die pharmakognostischen Untersuchungen. Leipzig & Wien.

WESTLING, R. P., 1927, Lärobok i farmakognosi. Uppsala.

WIDÉN, B., 1939, Undersökningar över floroglucinderivaten i rhizomen av *Dryopteris spinulosa* och *Dryopteris austriaca*. — Suomen Apteekkariyhdistyksen Aikakauslehti, 28, p. 279. Ausserdem auf deutsch: Untersuchungen über die Phloroglucinderivate von *Dryopteris spinulosa* und *Dryopteris austriaca*. — Pharmacia 19, p. 4.

YAGI, S., 1914, Physiologische Wertbestimmung von Filixsubstanzen und Filix-extrakten. — Zschr. ges. exp. Medizin, 3, p. 64.



Abb. 2. Längsschnitt durch den Wurzelstock von *Dryopteris spinulosa.* $\frac{1}{2} \times$ Abb. 4. Längsschnitt durch den Wurzelstock von *Dryopteris filix-mas.* $\frac{1}{2} \times$



Abb. 3. Längsschnitt durch den Wurzelstock von *Dryopteris austriaca*.  
 $\frac{1}{2} \times$



Abb. 5. Längsschnitt durch den Wurzelstock von *Athyrium filix-femina*.  
 $\frac{1}{2} \times$

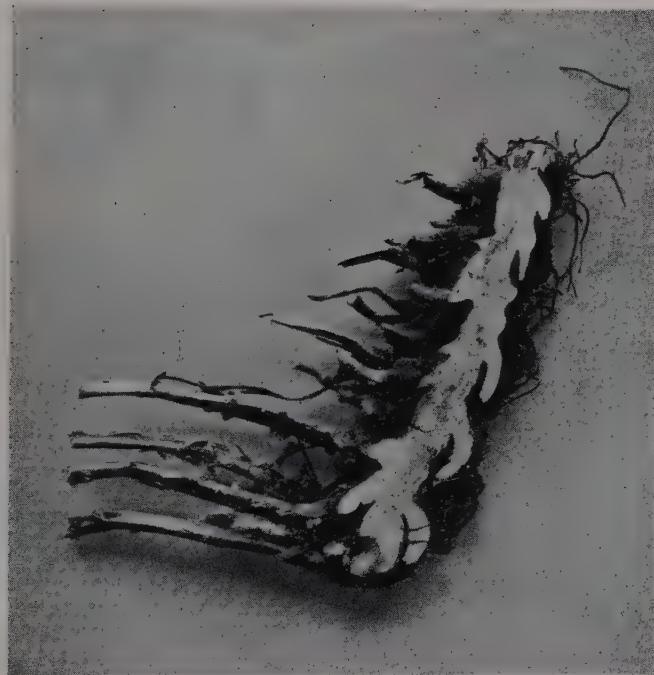


Abb. 4. Längsschnitt durch den Wurzelstock von *Dryopteris cristata*.  
 $\frac{1}{2} \times$

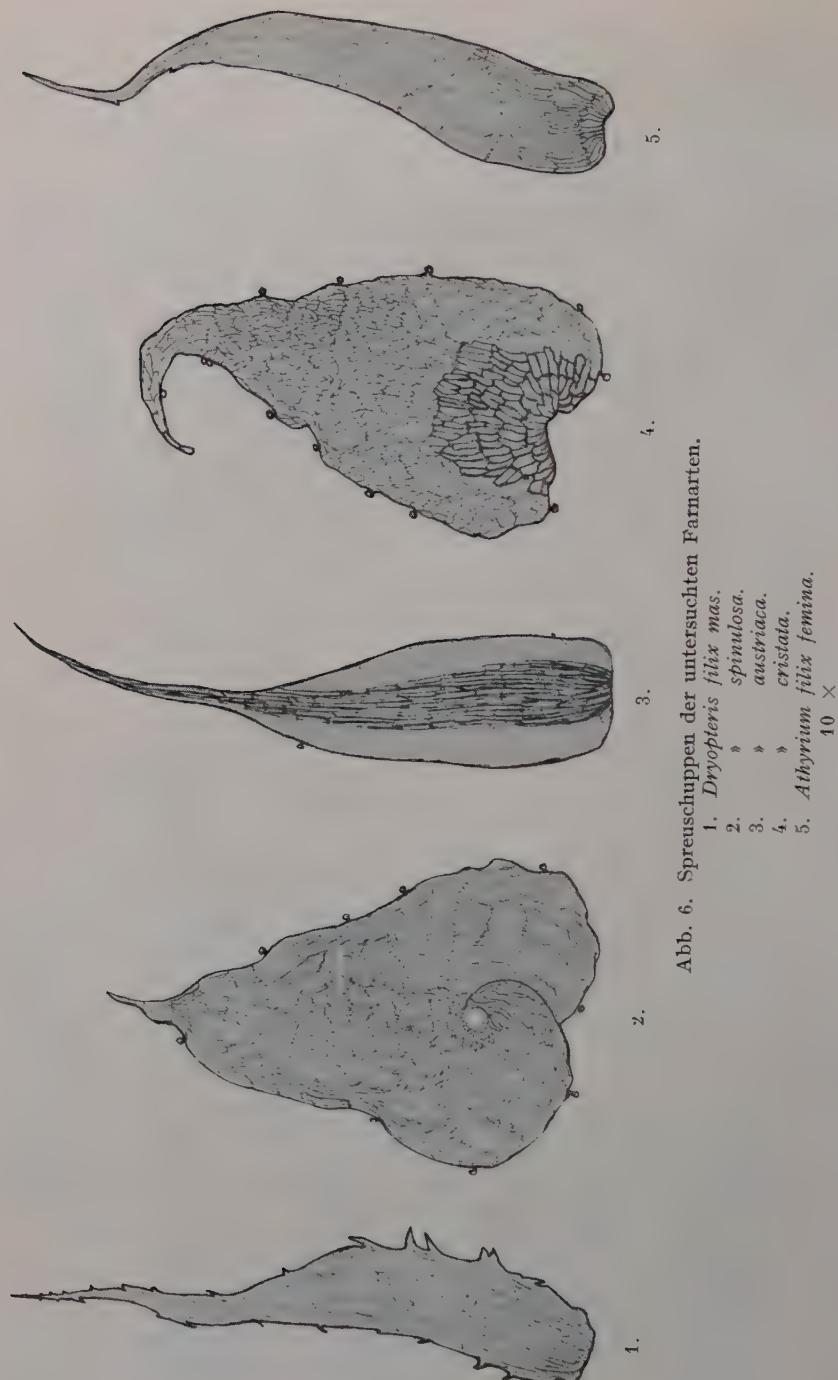


Abb. 6. Spreuschuppen der untersuchten Farnarten.

1. *Dryopteris filix-mas.*
2. " *spinulosa.*
3. " *austriaca.*
4. " *cristata.*
5. *Athyrium filix-femina.*

10 ×



Abb. 7—8. Längsschnitte durch die Blattstiellbasis von *Dryopteris austriaca*,  
Interzellularen mit inneren Sekrethaaren zeigend.  
72 ×



72 ×

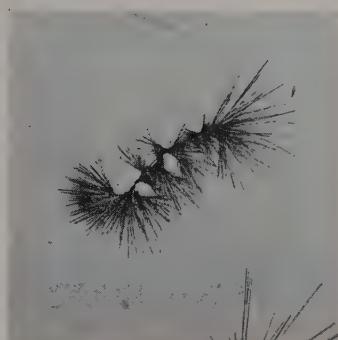


Abb. 9. Aspidin, umkristallisiert  
aus Alkohol.  
72 ×



Abb. 10. Mikrosublimat von  
Aspidin + Alkohol.  
72 ×



Abb. 11. Vakuumsublimat von  
Aspidin + Alkohol.  
72 ×

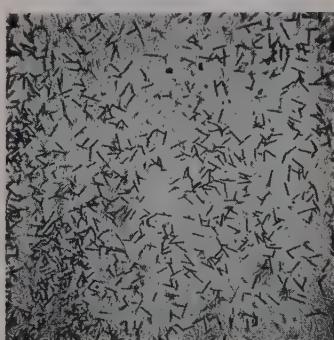


Abb. 12. Mikrosublimat von Alb-  
aspidin.  
72 ×

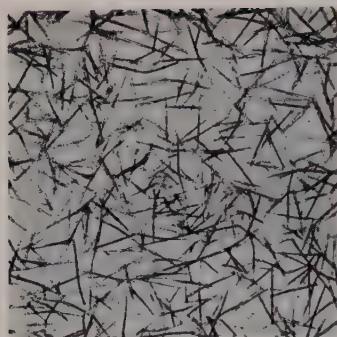


Abb. 13. Mikrosublimat von Alb-  
aspidin.  
72 ×



Abb. 14. Mikrosublimat von Alb-  
aspidin.  
72 ×



Abb. 15. Mikrosublimat von Alb-  
aspidin + Alkohol.  
72 ×



Abb. 16.  $\beta$ -Flavaspidsäure.  
72 ×

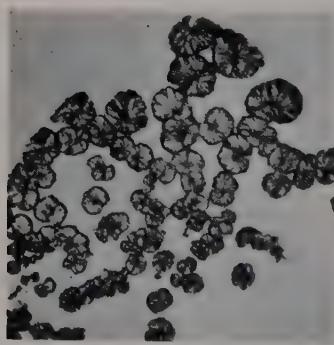


Abb. 17.  $\alpha$ -Flavaspidsäure.  
72 ×



Abb. 18.  $\beta$ -Flavaspidsäure, er-  
halten durch Erhitzen der  $\alpha$ -Form  
auf 140°.  
72 ×

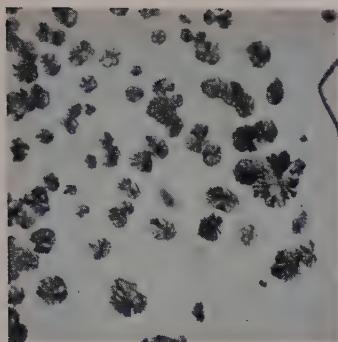


Abb. 19. Vakuumsublimat von  
Flavaspidsäure + Alkohol.  
72 ×

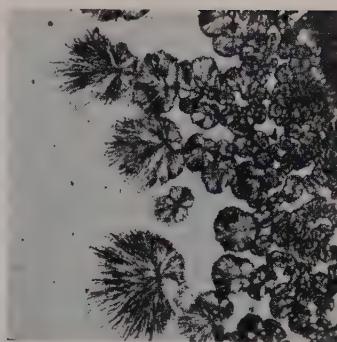


Abb. 20. Vakuumsublimat von  
Flavaspidsäure + Alkohol.  
72 ×

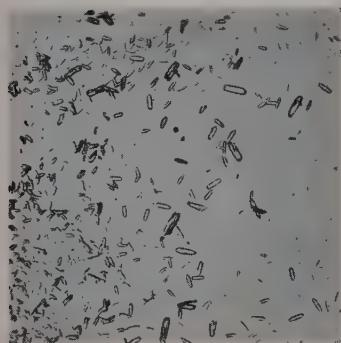


Abb. 21. Mikrosublimat von Fi-  
lixsäure.  
72 ×

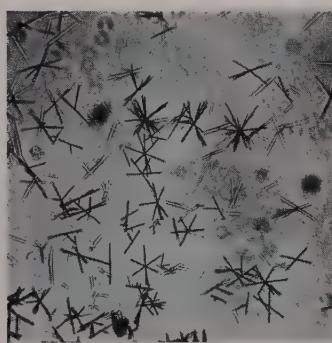


Abb. 22. Mikrosublimat von Fi-  
lixsäure + Alkohol. (Albaspidin.)  
72 ×



Abb. 23. Aspidinol + Semikarb-  
azid.  
72 ×

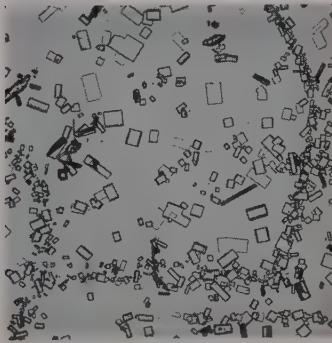


Abb. 24. Aspidinol, auf 130° er-  
hitzt.  
72 ×



Abb. 25. Kristallschuppe von Aspidinol, gebildet nach Abkühlung der Schmelze.

72 ×

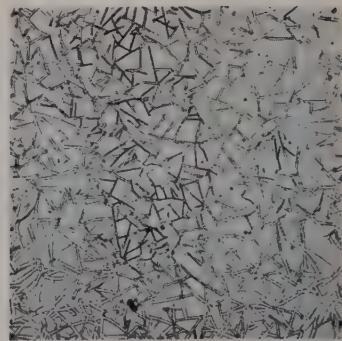


Abb. 26. Mikrosublimat von Aspidinol.

72 ×



Abb. 27. Mikrosublimat von Aspidinol.

72 ×



Abb. 28. Aspidinolsublimat + Alkohol.

72 ×



Abb. 29. Aspidinolsublimat + Semikarbazid.

72 ×



Abb. 30. Mikrosublimat von *Dryopteris spinulosa*.

72 ×



Abb. 31.  
Mikrosublimate von *Dryopteris spinulosa*.  
72 ×



Abb. 32.  
72 ×

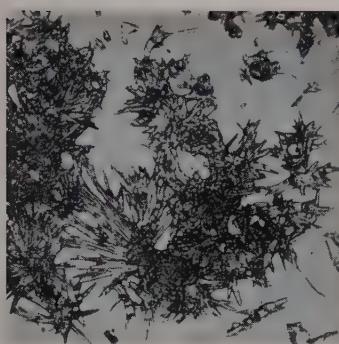


Abb. 33. Mikrosublimat von  
*Dryopteris spinulosa*.  
72 ×

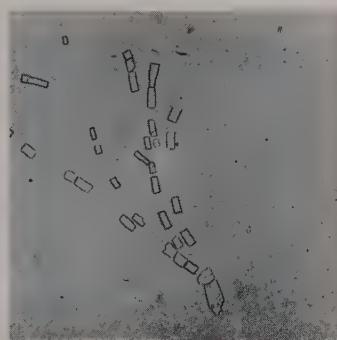


Abb. 34. *Dryopteris spinulosa*.  
Resublimat, auf 130° erhitzt.  
(Aspidinol.)  
72 ×



Abb. 35. *Dryopteris spinulosa*.  
Resublimat + Semikarbazid.  
72 ×



Abb. 36. *Dryopteris spinulosa*.  
Vakuumsublimat + Alkohol. (Alba-  
spidin.)  
72 ×



Abb. 37. *Dryopteris spinulosa*.  
Vakuumsublimat + Alkohol.  
(Aspidin.)  
72 ×



Abb. 38. *Dryopteris spinulosa*. Va-  
kuumsblimat des Niederschlags  
(siehe Text!) + Alkohol. (Aspidin.)  
× 72

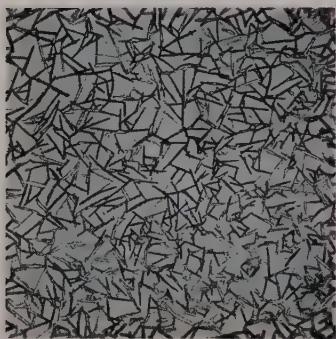


Abb. 39.  
Mikrosblimat von *Dryopteris austriaca*.  
72 ×



Abb. 40.  
72 ×

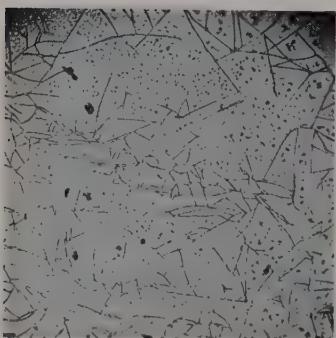


Abb. 41. Mikrosblimat von  
*Dryopteris austriaca*.  
72 ×



Abb. 42. *Dryopteris austriaca*.  
Mikrosblimat + Semikarbazid.  
72 ×

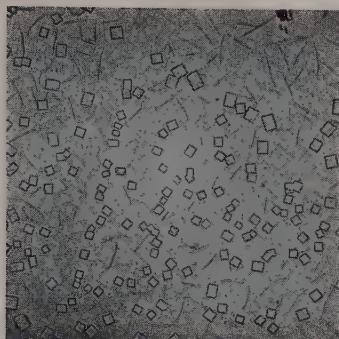


Abb. 43. *Dryopteris austriaca*.  
Resublimat bei 130°. (Aspidinol.)  
72 ×.



Abb. 44. *Dryopteris austriaca*.  
Vakuumsublimat + Alkohol.  
(Aspidin.) 72 ×



Abb. 45. *Dryopteris austriaca*.  
Vakuumsublimat + Alkohol. (Alba-  
spidin.)  
72 ×



Abb. 46. *Dryopteris austriaca*, Va-  
kuumsublimat des Niederschlags  
(siehe Text!) + Alkohol. (Aspidin.)  
72 ×



Abb. 47. Mikrosublimat von  
*Dryopteris filix-mas*.  
72 ×

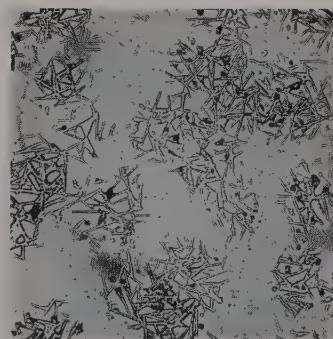


Abb. 48. Mikrosublimat von  
*Dryopteris filix-mas*.  
72 ×



Abb. 49. *Dryopteris filix mas.*  
Resublimat, auf 130° erhitzt.  
(Aspidinol.) 72 ×

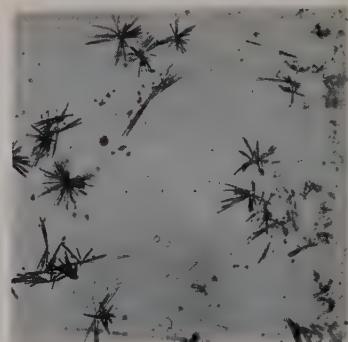


Abb. 50. *Dryopteris filix mas.*  
Resublimat + Semikarbazid.  
72 ×



Abb. 51. *Dryopteris filix mas.*  
Vakuumsublimat + Alkohol. (Alb-  
aspidin.) 72 ×

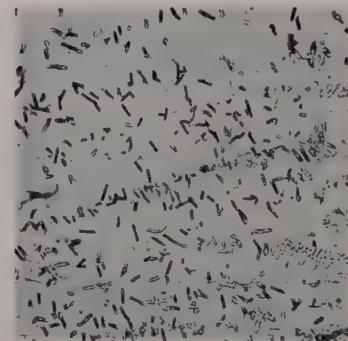


Abb. 52.  
Mikrosublimat von *Dryopteris  
cristata*.  
72 ×

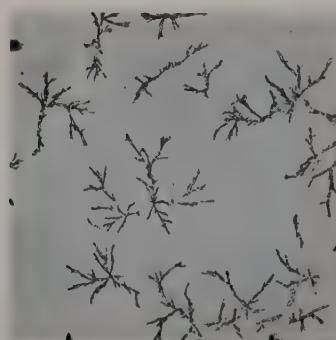


Abb. 53. Mikrosublimat von  
*Dryopteris cristata*.  
72 ×

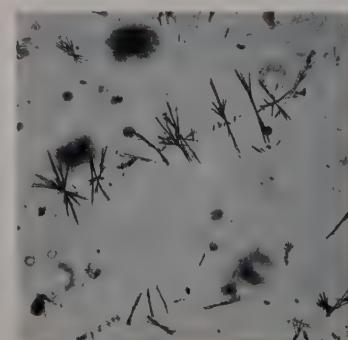


Abb. 54. *Dryopteris cristata*. Mikro-  
sublimat + Semikarbazid.  
72 ×

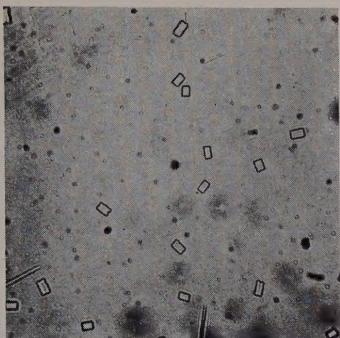


Abb. 55. *Dryopteris cristata*. Re-sublimat auf 130° erhitzt.  
(Aspidinol)  
72 ×

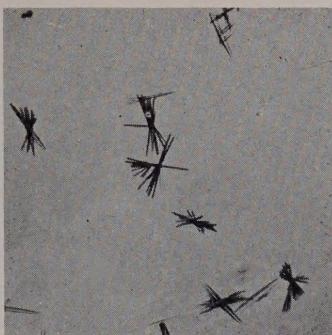


Abb. 56. *Dryopteris cristata*. Vakuumsublimat + Alkohol. (Albaspidin.)  
72 ×





